LICHT- UND ELEKTRONEN-MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR UNGESCHLECHTLICHEN VERMEHRUNG VON BESNOITIA BESNOITI (SPOROZOA, APIKOMPLEXA) IN ZELLKULTUREN

Rosina Maria Widauer

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0036

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR UNGESCHLECHTLICHEN VERMEHRUNG VON BESNOITIA BESNOITI (SPOROZOA, APIKOMPLEXA) IN ZELLKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rosina Maria Widauer
aus
Untersteppach

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan
Referent: Prof. Dr.Dr.h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 25. Februar 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meiner lieben Mutter

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Biologie und Morphologie der Besnoitien unter besonderer Berücksichtigung von Besnoitia besnoiti (anhand der Literatur) 2

III. Eigene Untersuchungen 20

A. Material und Methoden 20

B. Ergebnisse 22

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen 24
2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen 26
   a. Morphologie der Merozoiten 26
   b. Morphologie der Endodyogeniestadien 32

IV. Besprechung der Ergebnisse 41

V. Zusammenfassung 47

Summary 48

VI. Literaturverzeichnis 49

Lebenslauf

I. Einleitung

Besnoitia (Coccidia: Apikomplexa) gehört neben Toxoplasma, Sarcocystis, Frenkelia und Hammondia zur Gruppe der zystenbildenden Kokzidien. Bei vielen dieser Erreger wurden bereits Versuche durchgeführt, sie auf Zellkulturen zu übertragen. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich Besnoitia jellisoni und Hammondia hammondi auf Zellkulturen durch Endodyogenie, Toxoplasmen durch Endodyogenie und Schizogonie vermehren. Ferner entwickelten Sarcocystis suihominis auf menschlichen Fibroblastenzellkulturen und Sarcocystis muris auf Katzenlungenzellen Gamogoniestadien. Auch Besnoitia besnoiti wurde erfolgreich auf Zellkulturen angezüchtet. Eingehende Untersuchungen zur Vermehrung und Morphologie dieses Parasiten fehlen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Morphologie der in zwei verschiedenen Zellsystemen sich entwickelnden Stadien von Besnoitia besnoiti licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

II. BIOLOGIE UND MORPHOLOGIE DER BESNOITIEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON BESNOITIA BESNOITI
(anhand der Literatur)

BESNOIT und ROBIN (1912) beschrieben das Krankheitsbild der Besnoitiose bei einem Rind in Südfrankreich und fanden bei der mikroskopischen Untersuchung von veränderten Hautteilen zahlreiche Zysten eines Protozoen. Sie ordneten den Erreger der Krankheit dem Genus Sarcocystis zu, ohne jedoch einen neuen Speziesnamen einzuführen. MAROTEL (1912) schlug vor, die neubeschriebenen Organismen zu Ehren der Entdecker Sarcocystis besnoiti zu benennen. HENRY (1913) gebrauchte den Genusnamen Besnoitia und sprach von Besnoitia besnoiti. BRUMPT (1913) verwendete die Bezeichnug Gastrocystis besnoiti. Aufgrund von Ähnlichkeiten mit Vertretern der Gruppe Globidium führte WENYON (1926) den Namen Globidium besnoiti ein. FRENKEL (1953) schließlich schlug bei der Beschreibung einer neuentdeckten Spezies erneut den Genusnamen Besnoitia vor, der dann auch entgültig blieb.

Neben Besnoitia besnoiti sind noch weitere Arten von Besnoitia bekannt. So tritt Besnoitia benetti bei Pferden, Maultieren und Mauleseln in Afrika und bei Maultieren in Mexico auf (SCHULZ und THORBURN, 1955; TERELL und STOOKEY, 1973). B. tarandi befällt Rentiere und Caribous in Nordkanada und Alaska (CHOQUETTE und Mitarb., 1967). B. darlingi wurde in Mittelamerika beim Opossum sowie als einzige Besnoitienart auch bei wechselwarmen Tieren, nämlich Eidechsen, gefunden (SCHNEIDER, 1967). FRENKEL (1953) entdeckte als neue Spezies bei Weißfußmäusen in Nordamerika B. jellisoni. WALLACE und FRENKEL (1975) untersuchten Fäzes von wildlebenden Katzen auf Hawai und stießen dabei auf Oozysten, die an Nager verfüttert die Entwicklung typischer Besnoitiazysten auslösten. Für diese B. wallacei ist bisher kein natürlicher Zwischenwirt bekannt.

Der klinische Verlauf und die Pathologie der bovinen Besnoitiose werden von HOFMEYR (1945), SCHULZ (1960), POLS (1960) sowie BASSON, MC CULLY und BIGALKE (1970) beschrieben. Bei künstlicher Infektion kommt es nach einer Inkubationszeit von 6-10 Tagen zu einem Anstieg der Körpertemperatur bis zu 41,7°C (die Inkubationszeit bei natürlicher Infektion ist nicht bekannt). Während des Fieberschubes, der 2-6 Tage andauert, zeigen die Tiere Photophobie, Tränenfluß, schmerzhafte Ödeme und hämorrhagische Herde der Haut, vor allem an Kopf, Extremitäten und Scrotum. Diese Erscheinungen sind eine Folge von degenerativen und nekrotischen Veränderungen der Gefäßwände; bevorzugt betroffen sind kleine und kleinste Venen, in deren Wänden sich die Parasiten vermehren.

Zu dem hier beschriebenen Krankheitsverlauf kommt es bei natürlicher Infektion nur selten. Das folgende Stadium, das in den chronischen Zustand überleitet, ist vor allem durch Haarausfall und Hautveränderungen gekennzeichnet. Bindegewebige Induration führt zu Verdickung und Faltenbildung der Cutis. An ekzematösen Stellen, die ein seröses Exsudat absondern, kommt es leicht zu Sekundärinfektionen. Bei Bullen können die Gefäßläsionen in den Testes Nekrosen und Calzifizierungen der Tubuli seminiferi verursachen, was vorübergehende oder permanente Sterilität bedingt. Frühestens 16 Tage p.i. sind die ersten jungen Zystenstadien mit einem Durchmesser von ca. 45 µm mikroskopisch nachweisbar.

Das chronische Stadium ist gekennzeichnet durch Faltenbildung, Krusten und Verhärtungen der Haut, hervorgerufen durch Zysten mit einem Durchmesser bis zu 600 µm, die in Haut und Unterhaut liegen. Auch auf den Schleimhäuten des Respirationstraktes, auf der Sklera, in Fascien und im Genitaltrakt von Kühen (NOBEL und Mitarb., 1977) entwickeln sich Zysten.

Auffällig sind starke saisonale Schwankungen im Auftreten

der Besnoitiose. Zu Neuerkrankungen kommt es fast nur während der Frühjahrs- und Sommermonate, wobei subakute und chronische Verlaufsformen überwiegen. Unter 18 Monate alte Tiere erkranken nur sehr selten. Eine Rassendisposition scheint nicht vorzuliegen. Die befallenen Rinder bleiben lebenslang Zystenträger und sind gegen Neuinfektionen immun.

Die wirtschaftliche Bedeutung der Besnoitiose liegt vor allem in Gewichts- und Leistungsabfall, Sterilität bei Bullen (NEUMAN, 1972) und Wertminderung der Häute für die Lederverarbeitung (ENIGK und STIRTZ, 1963).

Die Diagnose ist im akuten Krankheitsstadium nur anhand der klinischen Symptome möglich. Ein Nachweis der Parasiten im Blutausstrich gelingt bei Rindern nur selten (POLS, 1960). Im chronischen Stadium können die Hautveränderungen leicht mit Sarcoptesräude verwechselt werden (HOFMEYR, 1945); anhand histologischer Untersuchung befallener Hautteile lassen sich jedoch eindeutig die typischen Zysten identifizieren. Als sichere und schnelle Nachweismethode bei epidemiologischen Untersuchungen gilt die Kontrolle der Konjunktivalschleimhaut. Alle erkrankten und auch ein Großteil der nur subklinisch betroffenen Rinder entwickeln dort Zysten (BIGALKE und NAUDE, 1962).

Eine wirksame Therapie der Besnoitiose ist bisher nicht bekannt. POLS (1960) führte Versuche mit einer Reihe von Pharmaka (Sulfonamide, Antibiotika, Formalin, u.a.) durch, konnte jedoch keine Beeinflußung des Krankheitsverlaufes erzielen. In neuerer Zeit verzeichneten LEE, LEE und MOON (1979) einen Heilungserfolg an künstlich infizierten Ziegen durch Behandlung mit 1 %igem Antimon.

Als Prophylaxe gegen die Ausbreitung in Beständen durch chronisch erkrankte Tiere empfiehlt BIGALKE (1968) Quarantäne-

maßnahmen und die Ausmerzung schwer befallener Tiere. BIGALKE und Mitarb. (1974) entwickelten einen Impfstoff für Rinder aus einem Antilopenstamm von Besnoitia besnoiti. Über die praktische Anwendung der Vakzine in größerem Umfang liegen noch keine Ergebnisse vor.

Außer bei Rindern treten natürliche Infektionen mit Besnoitia besnoiti auch bei Schafen und Ziegen auf. NEUMAN und NOBEL (1960) beschreiben gastroenterale Erscheinungen bei Vorhandensein von Zysten im Darm bei Schafen. BWANGAMOI (1967) entdeckte durch Besnoitiazysten verursachte Veränderungen gegerbter Häute von Ziegen in Kenya. KALINER (1973) fand Besnoitiazysten in den Alveolarsepten der Lungen von zwei Ziegen aus Zentralkenya, die an Pneumonie erkrankt waren.

Auch bei wildlebenden Wiederkäuern in Südafrika, nämlich bei Impalas, Gnus und Kudus, kommt Besnoitia besnoiti vor. BIGALKE und Mitarb. (1967) führten vergleichende Untersuchungen über Besnoitia bei Rindern und bei Antilopen durch. Sie stellten fest, daß es sich um verschiedene, untereinander sehr nahe verwandte Stämme handelt; denn es trat eine ausgeprägte Kreuzimmunität auf. Der Hauptunterschied besteht im Ort der Zystenbildung. Während der bovine Stamm die Haut bevorzugt, treten Zysten bei Antilopen fast ausschließlich in Gefäßwänden auf; besonders betroffen sind Lymph- und Blutgefäße von Extremitäten, Kopf und Hals (MC CULLY und Mitarb., 1966).

Die Besnoitiose experimentell infizierter Kaninchen unterscheidet sich von derjenigen der Rinder vor allem durch den stets akuten, schweren Krankheitsverlauf und die stärker ausgeprägte Parasitämie. Bis zu 50% der Versuchstiere verenden während des initialen Fieberstadiums. Während der Parasitämie können durch Blutübertragung leicht Passagen durchgeführt werden, mit deren steigender Anzahl die Erkrankung

zunehmend milder verläuft. Neben einer schweren Orchitis treten Hautveränderungen über der Nase und im supraorbitalen Bereich auf. Dort und in den Testes lassen sich die meisten Zysten nachweisen (POLS, 1954 a und b; BASSON und Mitarb., 1970).

Außer Kaninchen, die sich besonders gut als Versuchstiere für die Besnoitiose eignen, sind eine Reihe von weiteren Labortieren künstlich infizierbar. Goldhamster zeigten nach Verimpfung von Zystenmaterial zentralnervöse Symptome und entwickelten Zysten im Gehirn (NEUMAN und NOBEL, 1963). Künstlich infizierte weiße Mäuse lassen keinerlei klinische Symptome erkennen; Blutausstriche bleiben immer negativ, Gehirnemulsionen sind jedoch infektiös für Gerbils und Kaninchen (NEUMAN, 1965). In Gerbils vermehren sich die Parasiten in den inneren Organen und im Gehirn und verursachen zentralnervöse Störungen mit einer Mortalitätsrate von 60-70% (NEUMAN, 1962). Während es POLS (1960) nicht gelang, Meerschweinchen zu infizieren, berichteten NEUMAN und NOBEL (1981) über zentralnervöse Symptome bei Tieren, denen Merozoiten aus dem Peritonealexsudat von Gerbils verabreicht wurden.

Die künstliche Übertragung der Besnoitiose mit Hilfe von proliferativen Formen im Blut gelang erstmals CUILLE, CHELLE und BERLUREAU (1936). Sie verabreichten i.v. große Blutmengen (bis zu 5 l) von akut erkrankten Rindern im initialen Fieberstadium gesunden Tieren. Dabei stellten sie fest, daß das Blut nur über die Dauer der febrilen Phase infektiös war. Diese Erfahrung wurde von POLS (1960) und BIGALKE (1967) bestätigt. Übertragungsversuche von BESNOIT und ROBIN (1912), CUILLE und CHELLE (1937 a) und POLS (1960) mit Hilfe von parenteral oder enteral verabreichtem Zystenmaterial blieben erfolglos. BIGALKE (1967) gelang es erstmals, Kaninchen und Rinder mit Zystozoiten zu infizieren. Die Tiere entwickelten

aber nur eine sehr milde oder klinisch inapparente Form der Besnoitiose, die oftmals lediglich durch den Nachweis von vereinzelten Zysten diagnostiziert werden konnte. Durch diesen erfolgreichen Übertragungsversuch wurde das chronisch erkrankte Rind, das Zeit seines Lebens eine Vielzahl von Zysten beherbergt, in den Vordergrund des epizootiologischen Geschehens gerückt.

Bereits BARRAIRON (1938) und HERRIN (1952) äußerten aufgrund des saisonalen Auftretens der Besnoitiose die Vermutung, daß eine Übertragung durch Insekten erfolgt. BIGALKE (1960) wies nach, daß Tsetse-Fliegen bei Unterbrechung des Saugaktes in der Lage sind, Zystozoiten aus der Haut befallener Rinder auf gesunde Rinder und Kaninchen zu übertragen. Weitere Untersuchungen von BIGALKE (1968) zeigten, daß auch Tabaniden und Stallfliegen zur Übertragung geeignet sind. In allen Fällen handelte es sich jedoch nur um eine mechanische und keine zyklische Übertragung. Die Lebensdauer der Parasiten in den Mundwerkzeugen der stechenden Insekten betrug maximal 24 Stunden. Die mechanische Übertragung durch Insekten erklärt neben dem saisonalen Auftreten von Neuerkrankungen auch den Einfluß gemeinsamer Haltung von kranken und gesunden Tieren bei der Ausbreitung der Besnoitiose. Während CUILLE und CHELLE (1937 b) und POLS (1960) gemeinsamer Haltung keine Bedeutung einräumten, verzeichnete BIGALKE (1968) bei der Haltung von latent infizierten mit gesunden Rindern im Freien eine fast 100 %ige Übertragungsrate (39 von 40 Tieren wurden infiziert). Die Infektionen verliefen aber klinisch inapparent; sie konnten nur durch sorgfältige Überprüfung von Haut und Sklera auf Zysten und durch serologische Verfahren nachgewiesen werden.

ROMMEL (1975) führte Versuche mit Karnivoren und Vögeln als möglichen Überträgern oder Endwirten von Besnoitia besnoiti durch. Er verfütterte Infektionsmaterial von stark befallenen Rindern an Hunde, Katzen und einen Serval. Bei einem Teil der

Hunde und Katzen kam es zwar zur Ausscheidung von Oozysten; diese konnten aber nicht eindeutig identifiziert werden. In einer weiteren Versuchsreihe verabreichte er Zysten an Marabus und Zwerggänsegeier. Bei bis zu 8 Wochen p.i. durchgeführten Kotuntersuchungen konnten keine Dauerstadien nachgewiesen werden.

In einer Reihe von Experimenten verfütterten PETESHEV, GALUZO und POLOMOSHOV (1974) Zystenmaterial aus Haut und Aponeurosen von Rindern an Wölfe, Hunde, Steppenfüchse, Kaninchen, Zieselmäuse, weiße Mäuse, Saatkrähen, Igel, Ziegen- und Schaflämmer, Hauskatzen und an eine Wildkatze (Felis lybica). Wölfe, Steppenfüchse, Hunde, Igel und Krähen blieben reaktionslos, auch schieden sie keine Oozysten aus. Bei akut erkrankten Zieselmäusen und Kaninchen wurden Trophozoiten in den inneren Organen entdeckt. Im Gehirn der weißen Mäuse entwickelten sich 19 - 34 µm große Zysten. Zur Ausscheidung von Oozysten in den Fäzes kam es nur bei den infizierten Katzen. Täglich durchgeführte Kotuntersuchungen mit dem Flotationsverfahren zeigten bei der Wildkatze nach einer Präpatenz von 13 Tagen ovale Oozysten vom Isosporatyp mit einer durchschnittlichen Größe von 11,6-14,2 x 14,2-16,0 µm. 16 Tage p.i. entdeckte man im Kot der Hauskatzen ähnliche Oozysten für 3 - 5 Tage. Die Katzen erschienen während dieser Zeit klinisch gesund.

Im zweiten Versuch wurden diese Oozysten an Zieselmäuse, Ziegenlämmer und ein Kalb verabreicht. Die Ziegen zeigten nach 4 Tagen einen über mehrere Tage anhaltenden Fieberschub, blieben aber sonst klinisch unauffällig. Eine durchgeführte Komplementbindungsreaktion fiel stark positiv aus. Die Zieselmäuse verendeten nach 8 Tagen. In allen inneren Organen waren massenhaft Trophozoiten vorhanden. Das Kalb bekam ebenfalls nach 4 Tagen eine Temperaturerhöhung, die 4 Tage andauerte. 8 Monate p.i. hatten sich typische Besnoitiazysten

auf der Vaginalschleimhaut entwickelt; die KBR verlief positiv. In einem weiteren Versuch wurde zystenhaltiges Gehirn von weißen Mäusen an zwei Monate alte Kätzchen verfüttert. Nach einer Präpatenz von 6 Tagen kam es zur Ausscheidung der typischen Oozysten im Kot für 8 Tage. Danach verabreichte PETESHEV (1974) zystenhaltiges Gehirn von weißen Mäusen an erst 20 Tage alte Kätzchen. Hier ergab sich eine Präpatenz von 14 Tagen. Bei einer Zieselmaus, die mit Oozysten aus dem letzten Versuch oral infiziert wurde, konnten nach 8 Tagen Trophozoiten in allen inneren Organen nachgewiesen werden.

Die Autoren diskutierten die Notwendigkeit der Abgrenzung von Besnoitia und Toxoplasma im Versuch; sie wurde durch biologische Kontrollen (Infektionsketten) und serologische Kontrollen (KBR) sichergestellt. Die Präpatenz von Besnoitia und Toxoplasma scheint ähnlich zu sein. Leicht zu unterscheiden sind die Zysten sowohl nach ihrer Lokalisation (Toxoplasma nie in Haut und Sklera) als auch nach der Größe und anhand der Zystenhülle.

WALLACE und FRENKEL (1975) geben eine Beschreibung der intestinalen Entwicklungsphase von Besnoitia wallacei im Katzendarm. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß nach Verfütterung von zystenhaltigem Material aus Ratten und Mäusen im Katzendarm eine Gamogonie abläuft, der eine Schizogonie vorgeschaltet wird. Die Schizonten erschienen 4 - 14 Tage p.i. in der Lamina propria und konnten 10 Tage p.i. auch in der Leber gefunden werden. Reife Formen hatten einen Durchmesser von 500 - 800 µm. Sie befanden sich in den Endothel- und Intimazellen der Gefäße, wobei sie die Gefäßwand ins Lumen vorwölbten. Nach 13 - 16 Tagen traten Mikro- und Makrogamonten in den Becherzellen des Dünndarms auf. Die reifen Makrogameten waren mit 10 - 13 µm Durchmesser größer als diejenigen von Toxoplasma gondii, Hammondia hammondi und Sarcocystis muris. Die Ausscheidung unsporulierter,

12 x 17 µm großer Oozysten vom Isosporatyp setzte gewöhnlich nach 12 - 15 Tagen ein und dauerte 5 - 12 Tage an. Versuche, mit diesen Oozysten weitere Katzen zu infizieren, verliefen erfolglos. Die Empfänger schieden weder Oozysten aus, noch entwickelten sie selbst Zysten.

SMITH und FRENKEL (1977) beobachteten bei Besnoitia darlingi ebenfalls eine geschlechtliche Entwicklung in Katzen. Die mit zystenhaltigem Gewebe aus dem Opossum gefütterten Tiere schieden nach einer Präpatenz von 11 - 14 Tagen Oozysten vom Isosporatyp mit einem Durchmesser von 11,9 µm aus. Die Patenz betrug 5 - 8 Tage. Bei serologischen Kontrollen traten Antikörpertiter von 1:128 auf. Versuche, andere Katzen mit Oozysten zu infizieren, gelangen nicht. Übertragungen zwischen Mäusen mit Zystenmaterial konnten dagegen ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden. In freier Wildbahn spielt wahrscheinlich die Übertragung von Zwischenwirt zu Zwischenwirt durch Kannibalismus und das Fressen von Kadavern der Artgenossen neben der zyklischen Übertragung eine große Rolle.

BIGALKE (1962) versuchte zum erstenmal, Besnoitia besnoiti auf Zellkulturen anzuzüchten. Er beimpfte Nierenzellen von Kälbern und Lämmern mit Hodensuspensionen von künstlich infizierten, akut erkrankten Kaninchen und mit aufbereitetem Zystenmaterial aus der Haut von Rindern. Als Anzüchtungsmedium verwendete er Hank's Solution mit Zusatz verschiedener Antibiotika und 10% Rinderserum. Auffällig war, daß die extrazellulär gelegenen Parasiten im Medium der infizierten Kulturen, im Gegensatz zu den intrazellulären Formen, offensichtlich nur eine geringe Infektiosität besassen. Dauerpassagen konnten nur durchgeführt werden, wenn befallene Zellen mit intrazellulären Parasiten mitübertragen wurden. Bei Weiterverimpfung von ausschließlich Medium verlief die

Vermehrung der Besnoitien auf den folgenden Kulturen wesentlich langsamer und stagnierte nach sechs Passagen. Die Vermehrung in den Zellen erfolgte durch fortlaufende Zweiteilungen, was zu Parasitenanhäufungen führte. Es bestand eine auffällige Ähnlichkeit mit Toxoplasmen auf den Zellkulturen. Außerdem infizierte BIGALKE (1962) embryonierte Hühnereier mit Besnoitia besnoiti. Es entwickelten sich gelblich-weiße Herde auf der Chorioallantois- und Dottersackmembran, in denen zahlreiche Parasiten nachzuweisen waren.

NEUMAN (1974) beschreibt die Entwicklung von Besnoitia besnoiti auf Monolayer-Kulturen von Baby-Hamster-Zellen, Hela-Zellen und Schafthyreoidea-Primärzellkulturen im Earle's Medium, dem 10% Rinderserum zugesetzt wurde. Die Inokula bestanden aus Merozoiten künstlich infizierter Gerbils und aus Zystozoiten aus der Haut von natürlich erkrankten Rindern. Das Wachstum der Besnoitien auf Hamster- und Hela-Zellen verlief sehr langsam; außerdem ließen sich nicht mehr als 6 Passagen durchführen. Auf den Schafthyreoideazellen vermehrten sich die Parasiten sehr gut und konnten mit ständigen Passagen (alle 5 - 10 Tage) über 4 1/2 Jahre weitergezüchtet werden. Die Virulenz der Parasiten für Gerbils wurde dabei nicht gemindert. Die Vermehrung erfolgte ausschließlich durch Endodyogenie, wodurch Gruppen mit rosettenförmiger Anordnung entstanden. Wurde das Medium länger nicht gewechselt, war eine Größenabnahme der Parasiten festzustellen. Der Eindringungsvorgang wurde als Phagozytose beschrieben.

Zur Herstellung eines Impfstoffes infizierten BIGALKE, SCHOEMAN und MC CULLY (1974) Primärkulturen von fetalen Lammnierenzellen und Verozellkulturen mit einem Antilopenstamm von Besnoitia besnoiti. Hank's Solution mit Zusatz von 0,5% Lactalbuminhydrolysat, 10% Rinderserum und verschiedenen Antibiotika diente als Nährmedium für die Lammnierenzellen. Für die Verozellen wurde Eagle's Medium mit denselben Zu-

sätzen von Serum und Antibiotika verwendet. Die gewonnenen Parasiten dienten der Herstellung einer Vakzine für Kaninchen.

AKINCHINA und DOBY (1969) führten Untersuchungen über die Vermehrung von Merozoiten von Besnoitia jellisoni aus dem Peritonealexsudat von Mäusen auf verschiedenen Zellsystemen (Fibroblasten von Hühnerembryonen, Schweinenierenzellen, Kaninchennierenzellen und Nierenzellen von Schildkröten) durch. Als Kulturmedium diente "Medium 199" mit Zusatz von 10 - 20% Rinderserum. Neben der vorherrschenden Vermehrungsform der Endodyogenie konnten auch Mehrfachteilungen nachgewiesen werden. Die beobachteten Gebilde hatten eine gewisse Ähnlichkeit mit Schizonten von Plasmodium. Die Autoren vermuten jedoch,daß eine Polygenie zur Entstehung dieser Formen führte. SENAUD und MEHLHORN (1978) beimpften Hundenierenzellen mit Besnoitia jellisoni-Zystozoiten experimentell infizierter Labormäuse. Die ausschließlich durch Endodyogenie entstandenen Tochterzellen unterschieden sich deutlich von den Mutterzellen. Die typischen enigmatischen Körper der Zystozoiten waren verschwunden und die Länge der Zoiten von 4 - 6µm auf 3 - 4,5µm reduziert.

FAYER und Mitarb. (1969) infizierten verschiedene bovine Zellsysteme mit Zystozoiten von Besnoitia jellisoni aus weißen Mäusen und Kängururatten. Sie verwendeten Eagle's MEM, angereichert mit Earle's Salzen, Aminosäuren und 5 - 10% fetalem Kälberserum. Sie stellten fest, daß embryonale Zellkulturen offensichtlich bessere Voraussetzungen für die Vermehrung der Parasiten boten als adulte Zellen. Die meisten intrazellulären Organismen fanden sie nach 3 - 4 Tagen. Bereits 1 - 2 Tage später hatte ein Großteil der Parasiten die Zellen verlassen; es überwiegten die extrazellulären Formen. Die Vermehrung erfolgte durch Endodyogenie, teilweise verbunden mit Rosettenbildung; daneben traten auch schizontenähnliche Formen auf.

AZAB und BEVERLEY (1974) beimpften menschliche embryonale Lungenzellen mit Zystozoiten von Toxoplasma gondii. Sie stellten fest, daß das Auftreten von Schizonten von der Menge des Zusatzes von fetalem Kälberserum im Medium abhängig war; lag dieser unter 5 %, so kam es nicht zur Schizogonie. Bei Zusatz von 10 - 20% Serum entwickelten sich ca. 1% der eingedrungenen Zystozoiten zu Schizonten. Die übrigen intrazellulären Parasiten vermehrten sich durch Endodyogenie. Schizogonie und Endodyogenie liefen teilweise in derselben Zelle nebeneinander ab.

Die Gamogonie auf Zellkulturen in der Gruppe der zystenbildenden Kokzidien ist bisher nur bei Sarcocystis beschrieben. FAYER (1972) beobachtete die Entwicklung von geschlechtlichen Formen nach Beimpfung embryonaler boviner Nierenzellen mit Zystozoiten einer Sarcocystis-Art aus dem Star. 24 Stunden nach der Inokulation waren die ersten Mikro- und Makrogamonten erkennbar. Nach 30 Stunden lagen bereits aktiv bewegliche Mikrogameten, nach 42 Stunden Oozysten vor.

MEHLHORN und HEYDORN (1979) verfolgten die geschlechtliche Vermehrung von Sarcocystis suihominis auf menschlichen embryonalen Darm- und Hautfibroblastenzellen. Bereits nach 12 Stunden waren Mikro- und Makrogamonten zu unterscheiden, nach 18 Stunden erste Oozysten zu erkennen. Diese sporulierten ca. 4 Stunden später. TADROS und LAARMANN (1979) infizierten Katzenfibroblastenzellen mit Zystozoiten von Sarcocystis cuniculi. Nur ca. 2% der Parasiten waren in der Lage, innerhalb von 2 - 4 Stunden in die Zellen einzudringen. 16 - 18 Stunden p.i. war die Gamogonie weitgehend abgeschlossen.

BECKER, MEHLHORN und HEYDORN (1979) inkubierten verschiedene Zellkulturen mit Zystozoiten von 5 Sarcocystis-Spezies; die Erreger konnten zwar in alle Zellarten eindringen, eine geschlechtliche Vermehrung vollzog sich jedoch nur auf Zellen, die vom Endwirt stammten. Der zeitliche Ablauf der Gamogonie

und Sporogonie sowie die Morphologie der Gameten und Oozysten unterschieden sich nicht von der Entwicklung in vivo im Darm des Endwirts.

POLS (1954 b, 1960) beschreibt die Morphologie von Merozoiten von Besnoitia besnoiti, die er während des akuten Krankheitsstadiums bei Kaninchen fand. In den lichtmikroskopisch untersuchten Blut- und Organausstichen variierte die Größe der Zoiten von 5 x 2 µm bis 9 x 5 µm, wobei die in Monozyten und Histiozyten gelegenen Parasiten etwas kleiner waren als die extrazellulären. Während ovale Formen mit einem leicht zugespitzten Pol vor allem in Blutausstrichen auftraten, überwiegten in Organausstrichen bananen- und halbmondförmige Parasiten. Abgerundete Formen fand er nur selten. Der Autor bewertet die auftretenden Formvariationen bei Besnoitia besnoiti als natürlichen Polymorphismus. Das granulierte Zytoplasma der Merozoiten färbt sich mit Giemsalösung blau an. Der Nukleus liegt mehr oder weniger im Zentrum. Er kann sehr kompakt erscheinen (in der Regel bei bananenförmigen Parasiten) oder aber auch nur ein loses Chromatingerüst aufweisen.

Detaillierte Beschreibungen elektronenmikroskopischer Untersuchungen bei Besnoitia-Spezies liegen bisher nur von Besnoitia jellisoni vor. Die Besnoitien werden demnach aufgrund ihres typischen Aufbaus zu den Apikomplexa gezählt (SENAUD, 1969).

SHEFFIELD (1966) untersuchte Merozoiten von Besnoitia jellisoni aus dem Peritonealexsudat von Mäusen elektronenmikroskopisch. Die Pellikula der ovoiden oder bananenförmigen Parasiten besteht aus einer äußeren dünnen Membran von ca. 90 Å Dicke und einer inneren Membran, die ca. 150 Å breit ist. Letztere ist am apikalen Pol, wo sie den Polring bildet, und an einer seitlich in Kernhöhe gelegenen Mikropore unterbrochen. 22 subpellikuläre Mikrotubuli erstrecken sich vom apikalen Pol bis in Höhe des Nukleus. Das zylindrisch ge-

formte, im Polring liegende Conoid weist eine Länge von ca. 225 µm und einen Durchmesser von 250 µm auf. In Tangentialschnitten sind 6 oder 7 spiralige Elemente sichtbar, die das Gerüst des Conoids bilden. Den kranialen Teil des Parasiten füllt eine Gruppe von 3 bis 5 keulenförmigen Rhoptrien aus, deren sich verjüngende Enden in das Conoid einmünden. Gelegentlich ist unmittelbar am Conoid ein Vesikel zu beobachten, das über einen schmalen Gang am apikalen Pol nach außen tritt.

Die Mikroporen, von denen meist nur eine, manchmal auch zwei sichtbar sind, weisen einen Durchmesser von ca. 30 µm und eine Tiefe von ca. 40 µm auf. Auf Querschnitten werden 8 zirkulär angeordnete Fibrillen getroffen. Der rundliche Nukleus liegt in der Regel näher dem kaudalen Pol der Zelle. Er wird von einer mit Ribosomen besetzten Doppelmembran begrenzt, die an mehreren Stellen durch Kernporen unterbrochen ist. Unmittelbar über dem Kern liegt der Golgi-Apparat. In seiner Nähe befindet sich ein großes ovales Vesikel, das von mehreren Membranen umgeben ist (dickwandiges Vesikel). Dieses Gebilde wurde auch bei Toxoplasma gondii in frühen Teilungsphasen beobachtet und als Golgi-Adjunkt bezeichnet (SHEFFIELD und MELTON, 1968).

Das Zytoplasma weist viele freie Ribosomen und rauhes endoplasmatisches Retikulum, vor allem lateral und kaudal vom Nukleus auf. Ein langes Mitochondrium erstreckt sich von der Conoidregion bis in die Gegend des Golgi-Apparates. Die Teilung der intrazellulären Parasiten erfolgt ausschließlich durch Endodyogenie. Die auffallende morphologische Ähnlichkeit von Besnoitia und Toxoplasma, die bereits GOLDMANN, CARVER und SULZER,(1957), POLS (1960) und BIGALKE (1962) bei lichtmikroskopischer Betrachtung feststellten, wird hierdurch bestätigt. Eine Unterscheidung beider Gattungen anhand morphologischer Kriterien erscheint kaum möglich.

Die Entstehung der Zysten von Besnoitia besnoiti aus proliferierenden mononukleären Zellen wurde von POLS (1960) und SCHULZ (1960) dargestellt. Nach dem ersten Vermehrungsstadium in den Gefäßwänden des Zwischenwirts (BASSON, MC CULLY und BIGALKE, 1970) liegen nur einige Merozoiten in der deutlich sichtbaren parasitophoren Vakuole von Monozyten (Histiozyten). Mit der Vermehrung der Parasiten kommt es gleichzeitig zu Kernteilungen der Wirtszelle. Ihre Kerne besitzen ein wabiges Karyoplasma und viele vergrößerte Nukleoli. Sie werden an den Rand der Zelle gedrängt und ordnen sich so kreisförmig um die anwachsende parasitophore Vakuole an. Die reife Zyste weist nur mehr einen sehr schmalen Zytoplasmasaum auf, der sich schlauchförmig um die parasitophore Vakuole dehnt. Parallel zu den Vorgängen im Inneren der proliferierenden Wirtszelle kommt es zu Reaktionen des umgebenden Gewebes. Benachbarte Fibroblasten produzieren kollagene Fasern, die sich außen an die hypertrophierte Zelle anlegen und eine Kapsel bilden. Später kommt es zur Hyalinisierung der inneren Faserschicht, wodurch ein homogener innerer Teil der Zystenhülle entsteht, der von Kollagenfibrillen umgeben ist. Septierte Zysten treten auf, wenn mehrere Parasiten (bis zu 3) mit eigener parasitophorer Vakuole in die Wirtszelle eingedrungen sind.

Die Zystozoiten sind mit einer Länge von ca. 7 µm bei Rindern und 3 µm bei Kaninchen kleiner als die proliferativen Formen. Die Größe der Zysten beträgt beim Rind bis zu 600 µm (POLS, 1960) und liegt bei der Ziege zwischen 60 und 280 µm (KALINER, 1973) und bei Kaninchen zwischen 50 und 200 µm (POLS, 1954 b).

SHEFFIELD (1968) untersuchte Zysten von Besnoitia jellisoni aus Mäusen licht- und elektronenmikroskopisch. Er beschreibt eine extrazelluläre Hülle, eine stark vergrößerte, manchmal mehrkernige Wirtszelle und eine intrazellulär liegende Vakuole mit den Parasiten. Gelegentlich existieren 2 oder 3

durch Septen getrennte Vakuolen. Die langen, oft gelappten Kerne der Wirtszelle liegen in einem unterschiedlich breiten Zytoplasmasaum, der sehr viel endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien vom lamellären Typ enthält. Die parasitophore Vakuole wird von einer stark gefältelten Membran begrenzt, an deren Innenseite zahlreiche Vesikel sichtbar sind. Dies läßt vermuten, daß Stofftransport in die Vakuole hinein stattfindet, wobei nicht geklärt ist, ob dieser der Ernährung oder Zerstörung der Parasiten dient. Die Zystenwand besteht aus einer Lage feiner Fibrillen und kleiner dichter Granula, die in eine elektronenlichte Matrix eingebettet sind. In älteren Zysten verlaufen alle Fibrillen parallel zur Wirtszelle, während junge Zysten nur in der äußeren Schicht diese Anordnung zeigen. Der Teil der Hülle, der der Wirtszelle unmittelbar anliegt, erscheint nicht so dicht und besitzt weniger Fibrillen. Die Oberfläche der Wirtszellmembran ist durch viele mikrovilliähnliche Einstülpungen extrem vergrössert. Zahlreiche Vesikel, die sowohl außen als auch innen dicht an der Membran liegen, weisen auf Pinozytose hin. Die halbmond- oder birnenförmigen Zystozoiten sind von einer Pellikula umschlossen, die aus zwei Membranen besteht. 22 subpellikuläre Mikrotubuli laufen vom vorderen zum hinteren Polring. In Höhe des Nukleus befindet sich eine Mikropore. Die Zystozoiten besitzen außerdem ein Conoid, Rhoptrien, ein oder mehrere Mitochondrien vom Tubulus-Typ und Mikronemen, deren Anzahl mit zunehmendem Alter der Zyste ansteigt. Desweiteren findet man im Zytoplasma ovoide Glykogengranula, freie Ribosomen und gelegentlich einige Vakuolen. Der Golgi-Apparat liegt unmittelbar vor dem Nukleus. Die Zystozoiten unterscheiden sich von proliferativen Formen durch geringere Größe, erhöhte Anzahl von Mikronemen und Anwesenheit von Glykogengranula.

Der Aufbau der Mitochondrien im Zytoplasmasaum (vom Christa-Typ) zeigt deutlich, daß dieser Bereich der Wirtszelle zuzuorden ist. Während POLS (1960) die Meinung vertritt, daß die Zystenwand vom Wirt gebildet wird, läßt SHEFFIELD (1968) zwei

Möglichkeiten offen. Die Hülle kann sowohl von der Wirtszelle, deren hoher Ribosomengehalt und stark gefältelte Membran auf hohe Syntheseleistung und Stofftransport nach außen hinweisen, als auch von den Nachbarzellen gebildet werden, wofür der mehr fibröse, besser organisierte Außenbereich der Zystenwand spricht.

SENAUD (1969) untersuchte ebenfalls elektronenmikroskopisch Zysten von Besnoitia jellisoni aus Mäusen. Er entdeckte dabei die sogenannten enigmatischen Körper der Zystozoiten. Es handelt sich um spindelförmige, meist perinukleär angeordnete Gebilde mit einem osmiophilen Zentralbereich, der von einem elektronenlichten Ring und einer Membran umschlossen wird. Sie ähneln sehr stark Querschnitten von Mikronemen, weisen aber im Gegensatz zu diesen noch eine äußere Begrenzung auf. Der Aufbau gleicht dem von Mukozysten verschiedener Ziliaten. Die Bedeutung der enigmatischen Körper ist unbekannt.

Die Funktion der Mikropore bei Zystozoiten von Besnoitia jellisoni beschreibt SHEFFIELD (1967). Die anfangs noch sehr kleine Einstülpung der äußeren Membran erweitert sich immer mehr zu einem großen Vesikel, das sich schließlich abkugelt und nach innen abgestoßen wird. Das aufgenommene Material befindet sich dann in einer membranumschlossenen Vakuole im Innern des Zoiten. Danach nimmt die Mikropore wieder ihre ursprüngliche Größe an. Der Zylinder, den die innere Membran bildet, dient wahrscheinlich als Stützstruktur.

Die Feinstruktur der Zystenwand von Besnoitia jellisoni wurde von SCHOLTYSECK, MEHLHORN und MÜLLER (1974) untersucht. Die Autoren bezeichnen die Zysten von Besnoitia aufgrund ihres spezifischen Aufbaus als Pseudozysten. Der Begriff Pseudozyste wird definiert als "Wirtszelle mit parasitophorer Vakuole, deren naturgemäße Entwicklung zu einer Auflösung der Wirtszelle und zur Entstehung einer Zyste führt." Bei Toxoplasma tritt diese Form als Übergangsstadium während der Entwicklung der Zyste auf. Bisher wurden bei Besnoitia jellisoni nur Pseudozysten nachgewiesen. Ob alte Zysten eine Umwandlung zeigen

oder ob die Entwicklung auf der Stufe der Pseudozysten abgeschlossen ist, bedarf noch der Klärung.

SCHOLTYSECK, MEHLHORN und MÜLLER (1973) beschreiben ferner feinstrukturelle Kriterien zur Abgrenzung der Merozoiten von Besnoitia jellisoni von Merozoiten anderer zystenbildender Kokzidien. Abgesehen vom spezifischen Aufbau der Zyste, der leicht eine Identifizierung von Besnoitia zuläßt, geben die Anzahl der Organellen, die Größe des Conoids und die Anwesenheit von enigmatischen Körpern Aufschluß. So besitzen Merozoiten von Besnoitia jellisoni in der Regel eine Mikropore, 22 subpellikuläre Mikrotubuli, 3 - 5 Rhoptrien und 80 - 100 Mikronemen, die Zystozoiten zusätzlich 20 - 30 enigmatische Körper. Wie bei Toxoplasma enthalten die Zysten nur Zystozoiten mit voll ausgebildetem Apikalkomplex.

Merozoiten von Besnoitia jellisoni in Makrophagen und Zysten von experimentell infizierten Labormäusen untersuchten SENAUD, MEHLHORN und SCHOLTYSECK (1974) elektronenmikroskopisch. Die phagozytierten Parasiten werden offensichtlich nur in Ausnahmefällen lysiert, sie liegen meist unbeschädigt in den Zellen. Die Autoren vermuten, daß mononukleäre Zellen lediglich als Transportmittel zur Invasion spezifischer Gewebe dienen. Die Vermehrung in Makrophagen und Zysten erfolgte durch Endodyogenie und gelegentlich durch Endopolygenie.

FEDOSEENKO (1979) führte elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zysten von Besnoitia besnoiti vom Rind durch. Eine innere Membran, bestehend aus der Wand der parasitophoren Vakuole und Material von degenerierenden Zystozoiten, wird von radiär angeordneten Kanälchen durchzogen. Die mittlere Lage der Zystenhülle mit 20 - 35 um Durchmesser wird von der hypertrophierenden Wirtszelle gebildet. Außen schließt sich eine 60 - 100 um breite Schicht an, die aus zwei Lagen von Kollagenfibrillen besteht. Die Zystozoiten scheiden 30 - 60 um große Vesikel ab, die zur Bildung der inneren Membran beitragen.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Das Parasitenmaterial für meine Untersuchungen wurde mir freundlicherweise von der virologischen Abteilung des Instituts (Prof. Dr. Munz) zur Verfügung gestellt, in der bereits seit mehreren Jahren regelmäßige Passagen von Besnoitia besnoiti auf Verozellkulturen (Nierenzellen von grünen Meerkatzen) durchgeführt werden. Es handelt sich um einen Parasitenstamm, der aus Hautzysten natürlich erkrankter Rinder in Südafrika isoliert und anschließend an Zellkulturen adaptiert wurde. Im Rahmen meiner Untersuchungen wurden neben den bisher ausschließlich verwendeten Verozellen auch Katzennierenzellen (CRFK-Zellen) beimpft.

Beide Zellsysteme lagen als Monolayerkultur, bei 37°C inkubiert, vor. Zum Anzüchten der Verozellen fand HEPES-gepuffertes "Medium 199" mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum Verwendung. Als Erhaltungsmedium diente Eagle's-MEM mit 2 % fetalem Kälberserum. CRFK-Zellen wurden in Eagle's-MEM unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum angezüchtet und in dem selben Medium mit 2 % Kälberserumzusatz erhalten. Die Impfdosis betrug sowohl bei Vero- als auch bei CRFK-Zellen 3 Mio. Parasiten pro Schale.

Von beiden Zellsystemen entnahm ich für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen 1, 3, 6, 12, 18 und 24 Stunden sowie 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tage nach der Beimpfung je eine Schale mit den Zellen und Parasiten, außerdem jeweils eine unbeimpfte Kontrollschale. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Cellscrapers (Costar).

Zunächst stellte ich von jeder Probe einen Ausstrich her, der für die lichtmikroskopische Untersuchung mit Methanol fixiert und anschließend nach Giemsa gefärbt wurde. Danach

zentrifugierte ich die vorliegende Zellsuspension 10 Minuten bei 2500 U/Min., dekantierte das überstehende Medium und resuspendierte den Bodensatz zur Fixierung in 2,5 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (ph 7,4) für die Dauer von 1 Stunde bei 4°C. Anschließend wurde mit 0,1 M Cacodylatpuffer mindestens viermal gewaschen. In der Waschlösung lagerten die Proben bis zur Weiterverarbeitung einige Stunden bis mehrere Tage.

Die Nachfixierungszeit in 1 %igem Osmiumtetraoxid in 0,1 M Cacodylatpuffer betrug 1 Stunde. Nach viermaligem erneutem Waschen erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe, zunächst in 50 %igem Äthanol für 15 Minuten. Im 70 %igen Äthanol wurde unter Zusatz von 1 % Uranylacetat für 12 Stunden am Block zwischenkontrastiert. Nach 30 Minuten Anwendung von 90 %igem Äthanol diente Propylenoxid für 2 x 15 Minuten als Intermedium. Einer Mischung aus 1 Teil Durcupan ACM und 1 Teil Propylenoxid, nach 1 Stunde ersetzt durch eine Mischung aus 3 Teilen Durcupan ACM und 1 Teil Propylenoxid für 12 Stunden, folgte zweimal eine einstündige Einwirkungszeit von reinem Durcupan ACM bei 50°C im Brutschrank. Nach der Einbettung der Proben in Gelatinekapseln mit reinem Durcupan ACM betrug die Polymerisationszeit des Kunstharzes bei 60°C im Brutschrank 62 Stunden.

Auf einem Ultrotom III (LKB) stellten wir Semi- und Ultradünnschnitte her. Für den Schneidevorgang wurden sowohl Glasmesser als auch Diamantmesser verwendet.

Die Semidünnschnitte färbte ich für die lichtmikroskopische Betrachtung mit Methylenblau-Azur II.

Die Ultradünnschnitte wurden auf Formar-befilmte Kupfernetze übertragen und mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen führte ich

mit einem Photomikroskop (Leitz) durch, die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte an einem Elmiskop 101 (Siemens).

B. Ergebnisse

Bei der Anzüchtung von Besnoitien auf Verozellen verläuft die Vermehrung sehr unterschiedlich. In den Phasen rascher Reproduktion werden bereits 4-5 Tage p.i. zahlreiche extrazelluläre, in Gruppen beieinanderliegende Parasiten und zytopathische Effekte im Zellrasen beobachtet. 6-7 Tage p.i. sind die Zellen durch den massiven Befall bereits weitgehend zerstört und abgelöst. Es treten alsdann Phasen langsamer Vermehrung auf, in denen es mehrere Wochen dauert, bis vereinzelt extrazelluläre Parasiten nachweisbar sind.

Nach der Beimpfung der Proben verringert sich die Anzahl der im Medium vorhandenen Parasiten innerhalb von 12 bis 18 Stunden, sodaß 24 Stunden p.i. nur vereinzelt freischwimmende abgerundete Parasiten, jedoch zahlreiche Detritusteile mit der Stereolupe erkennbar sind; anscheinend fällt ein Großteil der Impflinge der Degeneration anheim. Dies wird durch die Befunde der Licht- und Elektronenmikroskopie bestätigt; zu dieser Zeit sind nur vereinzelt intrazelluläre Parasiten zu erkennen. 48 Stunden p.i. liegen in den jetzt deutlich ausgebildeten parasitophoren Vakuolen bereits Gruppen mit bis zu 10 Parasiten, während nach 3 Tagen große ungeordnete Haufen mit über 30 Zoiten und regelmäßig geformte Rosetten mit mehr als 20 Parasiten zu beobachten sind. Zahlreiche intrazelluläre Parasiten sind auf Katzenzellen jeweils am 2. und 3. Tag p.i., auf Verozellen am 3. und 4. p.i. nachzuweisen; 1-2 Tage später überwiegen die extrazellulären Formen.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

C	Conoid
CE	Chromatin
CR	Conoidale Ringe
CY	Zytostom
DR	Ausführungsgänge der Rhoptrien
DV	Dickwandiger Vesikel
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GO	Golgi-Apparat
IM	Innere Membran der Pellikula
L	Lipoid
MA	Merozoitenanlage
ME	Merozoit
MI	Mitochondrium
MN	Mikronemen
MZ	Mutterzelle
N	Nukleus
NF	Kernspindel
NU	Nukleolus
OM	Äußere Membran der Pellikula
P_{1+2}	Polringe 1+2
PG	Polysaccharidgrana
PV	Parasitophore Vakuole
R_{1+2}	Präconoidale Ringe 1+2
RH	Rhoptrien
RI	Ribosomen
SMT	Subpellikuläre Mikrotubuli
TZ	Tochterzelle
VE	Vesikel
WN	Wirtszellkern
WZ	Wirtszelle

Die auf den Abbildungen verwendeten Meßbalken entsprechen, falls nicht gesondert aufgeführt, 1 um.

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Größe der Erreger schwankte zwischen 6 x 1,5 µm und 8,5 x 3,2 µm. Die nach Giemsa gefärbten Ausstriche zeigten Parasiten mit blau angefärbtem, teilweise leicht granuliertem Zytoplasma und rotem Kernmaterial. Neben schlanken langgestreckten oder leicht gekrümmten Formen mit kräftig angefärbtem Zytoplasma und kompaktem oder gekörntem, zentral gelegenem Kern, traten große ovale Parasiten (Abb. 1) auf, deren Zytoplasma schwächer angefärbt ist und vereinzelt kleine, runde dunkelrot gefärbte Granula aufweist. Sie besitzen einen großen Zellkern mit lockerem Chromatingerüst.

Abb. 1 - 4: Entwicklungsstadien von Besnoitia besnoiti (lichtmikroskopisch)
1. Birnenförmige Zoiten mit schwach angefärbtem Kern und Zytoplasma, kurz vor der Teilung, (CRFK-Zellen, 2 Tage p.i.)
2. Endodyogenie: die Tochterzellen sind an ihrer Basis noch miteinander verbunden, (a = Verozellen, 5 Tage p.i.; b = CRFK-Zellen, 2 Tage p.i.)
3. Gruppe von paarweise liegenden, ausdifferenzierten Merozoiten, (Verozellen, 4 Tage p.i.)
4. Rosettenförmige Anordnung von Merozoiten, die an ihrer Basis noch miteinander verbunden sind, (Verozellen, 3 Tage p.i.)

An freiliegenden oder durch den Ausstrich freigesetzten Merozoiten waren Zweiergruppen zu erkennen, deren durch Endodyogenie entstandenen Zoiten bereits weitgehend ausdifferenziert waren (Abb. 2 a und b). Später traten Gruppen von 4 und mehr Parasiten auf, die entweder getrennt lagen oder noch an ihrer Basis verbunden waren (Abb. 3). An der Verbindungsstelle erschien das Zytoplasma heller und wabig aufgelockert. Diese Gruppen bestanden meist aus einem Vielfachen von 2 Zoiten; neben der oft sichtbaren paarweisen Anordnung weist dies darauf hin, daß sie durch Endodyogenie entstanden sind. Große Parasitenanhäufungen mit 30 und selten mit mehr Zoiten lagen entweder völlig ungeordnet oder wiesen Rosettenformen auf (Abb. 4).

Die Gestalt der noch intrazellulär liegenden Parasiten konnte wegen der Überlagerung mit dem Wirtszellzytoplasma nur schwer beurteilt werden. Durch die Anwesenheit von bis zu 60 Kernen, die dicht gedrängt in einer parasitophoren Vakuole liegen, entsteht der Eindruck, daß es sich bei diesen Formen nur um kleine Zoiten handeln könnte. Andererseits zeigten sich in einer Wirtszelle oft beträchtliche Mengen von Zoiten, die auf 1-2, gelegentlich auch auf bis zu 6 parasitophore Vakuolen verteilt waren.

2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

a. Morphologie der Merozoiten

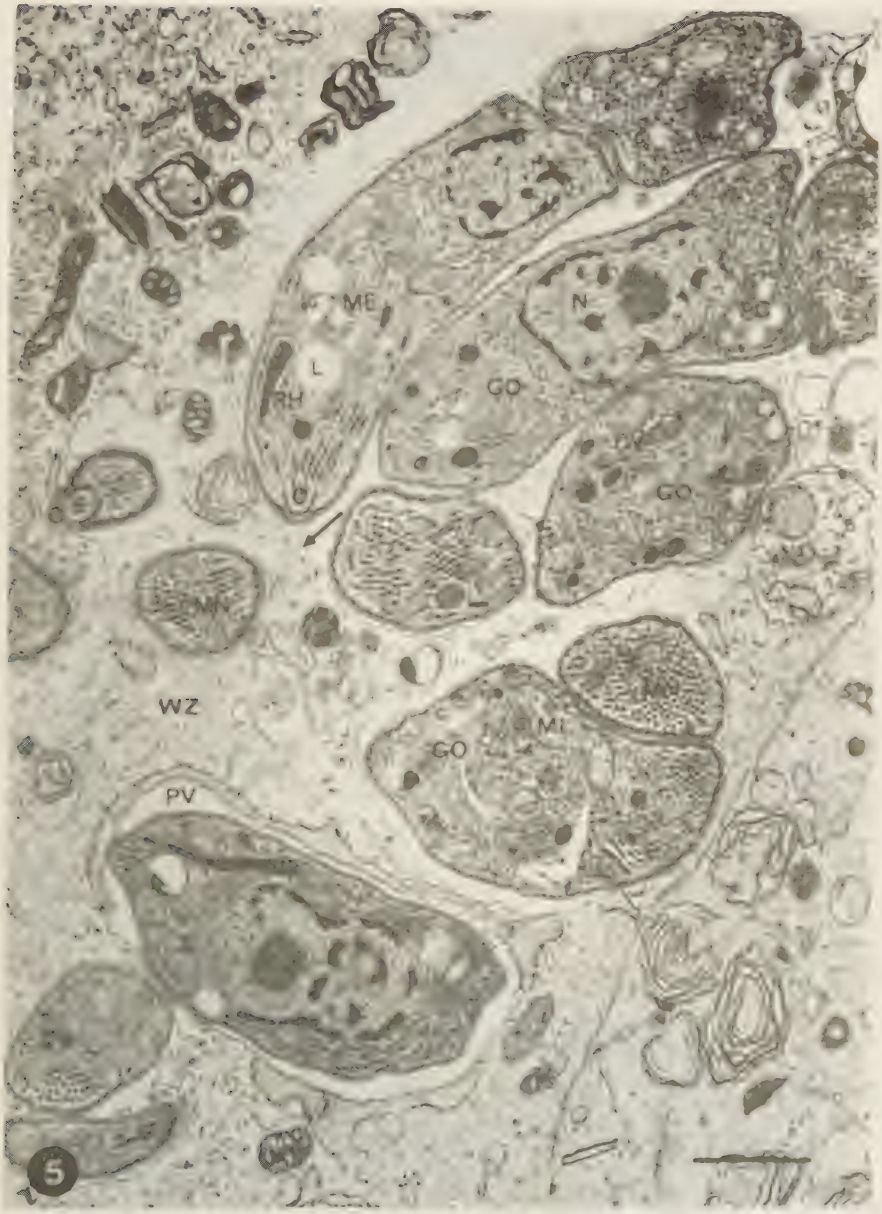
Intrazelluläre Parasiten (Abb. 5) lagen immer in einer membranumschlossenen parasitophoren Vakuole; sie stehen demzufolge nicht in direktem Kontakt mit dem Wirtszellzytoplasma. Einzeln auftretende Merozoiten wurden von der dichtanliegenden Vakuolarmembran umschlossen, so daß sich die parasitophore Vakuole nur als schmaler Saum darstellte. Mittelgroße Parasitengruppen (Abb. 17) lagen oft in so großen Vakuolen, daß zwischen den einzelnen Zoiten reichlich Platz blieb, während mächtige Parasitenanhäufungen (Abb. 20) meist dicht gepackt auftraten.

Die Vakuolarmembran zeigte einen unregelmäßigen, gewellten Verlauf. Teilweise kam es zur Ablösung von Membranteilen, die dann als unregelmäßig geformte tubuläre oder vesikuläre Gebilde frei in der Vakuole lagen (Abb. 5).

Die kurz nach der Beimpfung häufig angetroffenen extrazellulären Parasiten sind durch große Vakuolen und eine zunehmende degenerative Auflösung der Zellorganellen gekennzeichnet.

Die Ultradünnschnitte zeigten je nach Schnittführung neben langgestreckten, halbmondförmigen oder ovalen, am Vorderende zugespitzten Zoiten auch ovoide bis runde Formen. Öfters traten abgeknickte Merozoiten auf, oder solche, deren Pellikula tiefe Einbuchtungen aufwies.

Abb. 5: Gruppe von in einer parasitophoren Vakuole liegenden Besnoitien; die Vakuolarmembran (Pfeil) zeigt einen unregelmäßigen Verlauf; Merozoiten mit für Kokzidien typischem Apikalkomplex. (Verozellen, 4 Tage p.i.)


ME
L
RH
GO
N
GO
GO
MI
WZ
GO
MI
PV
5

Die Pellikula (Abb. 6) der Merozoiten besteht aus 3 Membranblättern. Das äußere Blatt ist mit ca. 10 nm Dicke etwas zarter als die von den beiden inneren Blättern gebildete Doppelmembran, die insgesamt eine Dicke von ca. 15 nm aufweist. Beide sind deutlich durch einen elektronenlichten Intermembranspalt getrennt, in dem sich kleine Vesikel befinden können. Das äußere Blatt der Pellikula umschließt den ganzen Parasiten, wobei es über dem Conoid etwas ausgebuchtet wird (Abb. 7 und 8). Das innere Membranblatt ist am apikalen Pol unterbrochen und bildet dort eine zirkuläre osmiophile Verdichtung, den vorderen Polring (Abb. 7). Bei höherer Auflösung des Polrings konnte festgestellt werden, daß hier die Membran mit 2 hintereinanderliegenden osmiophilen Verdickungen endet. Die Parasiten besitzen demnach 2 vordere Polringe (Abb. 7). Sie lassen eine Öffnung frei, in der das zylindrisch geformte Conoid mit einer Höhe von ca. 0,25 µm und einem Basisdurchmesser von ca. 0,23 µm liegt. Dieses erscheint auf Querschnitten kompakt, während Längsschnitte den Aufbau aus 7 ringförmigen Elementen erkennen lassen. Tangential getroffen wird die spiralige Anordnung der Ringe sichtbar, die das Bild einer komprimierten Sprungfeder vermittelt (Abb.9). Vor diesen liegen die beiden präconoidalen Ringe (Abb. 7 und 9), sowie die apikale Öffnung des Conoids.

Abb. 6: Merozoit mit ringförmigem Mitochondrium vom Tubulus-Typ und zwei angeschnittenen Zytostomen (CY), (Verozellen, 12 Stunden p.i.)

Abb. 7: Conoid, in den vorderen Polringen (P_1 + P_2) liegend, (CRFK-Zellen, 3 Tage p.i.)

Abb. 8: Conoid mit präconoidalen Ringen (R_1 + R_2); im Inneren liegen 4 kleine Vesikel (VE), (CRFK-Zellen, 3 Tage p.i.)

Abb. 9: Tangential angeschnittenes Conoid mit spiralig angeordneten conoidalen (CR) und zwei präconoidalen Ringen (R), (Verozellen, 24 Stunden p.i.)

Abb. 10: Quer angeschnittenes Conoid mit Ausführungsgängen der Rhoptrien (DR) und subpellikulären Mikrotubuli (SMT), (CRFK-Zellen, 3 Tage p.i.)

CY
OM
IM
MI
CH
N
CY
6
0.5 µm
P
1-2
SMT
IM
7
0.5 µm
R
1-2
8
R
R
9
0.5 µm
DR
SMT
10
0.5 µm

Häufig sind innerhalb des Conoids die Ausführungsgänge von 2-3 Rhoptrien, daneben auch einzelne kleine Vesikel angeschnitten. 22 subpellikuläre Mikrotubuli (Abb. 10), die auf Querschnitten ein deutliches Lumen zeigen, entspringen im Bereich des vorderen Polrings und laufen divergierend unter der Pellikula entlang nach hinten.

Die Merozoiten besitzen mehrere Mikroporen (Abb. 6). Dort ist die Innenmembran der Pellikula unterbrochen und bildet einen verdickten Zylinder von ca. 30 nm Durchmesser, in den sich die äußere Membran, deren Kontinuität erhalten bleibt, säckchenartig einbuchtet. Die bis zu 100 in einem Merozoiten zählbaren Mikronemen sind häufig im apikalen Bereich anzutreffen, wo sie oft in größeren Gruppen beieinander liegen. Sie verlaufen in Längsrichtung von vorne nach hinten (Abb. 5).

Die Rhoptrien, von denen auf Längsschnitten bis zu 12 pro Parasit sichtbar sind, präsentieren sich als elektronendichte, langgestreckte, keulenförmige Strukturen, die sich von 100 - 125 nm Durchmesser im hinteren Bereich auf 20 - 25 nm verjüngen, bevor sie ins Conoid einmünden (Abb. 5). Meistens liegen sie im apikalen Zelldrittel des Parasiten, gelegentlich trifft man sie auch hinter dem Kern an.

Der unregelmäßig rundlich oder oval geformte Nukleus befindet sich auf Längsschnitten meist in der hinteren Hälfte des Zoiten. Er wird von 2 Membranen umschlossen, zwischen denen sich der unterschiedlich breite Perinuklearraum darstellt. Diese Doppelmembran wird an den Kernporen, über die sich nur eine einzelne dünne Membran spannt, unterbrochen. Gelegentlich ist der direkte Übergang der äußeren Kernmembran in das Röhrensystem des ER und damit die offene Verbindung des ER mit dem Perinuklearraum sichtbar. Die äußere Kernmembran ist stellenweise dicht mit perl-

schnurartig aufgereihten Ribosomen besetzt. Der Nukleolus befindet sich meist im Zentrum des Kerns, kann aber auch am Rand liegen. Die Kerne besitzen unregelmäßig geformte Chromatinverdichtungen, die sich im Zentrum, meist aber im Randbereich, der inneren Kernmembran angelagert, befinden.

Rauhes ER, bestehend aus dicht mit Ribosomen besetzten Tubuli, wird vor allem in Kernnähe angetroffen. Daneben finden sich zahlreiche freie Ribosomen über das ganze Zytoplasma verteilt. Besonders viele scheinen in Zoiten vorhanden zu sein, die sich gerade in Teilung befinden (Abb. 11).

Der Golgi-Apparat (Abb. 5) steht immer in enger räumlicher Beziehung zum Kern. Er liegt stets unmittelbar apikal vom Nukleus, oft sogar in einer Einbuchtung der Kernhüllen, und besteht aus mehreren geschichteten, im Zentrum komprimierten, schüsselförmig gebogenen lamellären Säckchen, von denen zur Peripherie hin einzelne Vesikel abgeschnürt werden. Bei manchen Zoiten zeigt die äußere Kernmembran Ausstülpungen zum Golgi-Apparat hin (Abb. 11). In der Nähe des Zellkerns tritt gelegentlich ein homogener bis feingranulierter Vesikel auf, der von mehreren Membranen umschlossen wird. Er ist ovoid und weist manchmal im Zentrum eine Einschnürung auf (Abb. 15).

Bei den vielfach getroffenen Mitochondrien handelt es sich um mehrere Anschnitte eines einzelnen, stark verästelten Mitochondriums vom Tubulustyp. Als Besonderheit konnte bei einigen Merozoiten ein ringförmiges Mitochondrium beobachtet werden (Abb. 6). Außerdem findet man im Zytoplasma Einschlüsse von Lipiden und Polysacchariden. Erstere erscheinen als unregelmäßig große, runde, elektronenlichte Granula (Abb. 5). Die etwas kleineren, in der Größe weitgehend konstanten Polysaccharide stellen sich etwas dunkler dar und besitzen ein helles Zentrum, was ihnen ein perlenähnliches Aussehen verleiht (Abb. 5).

b. Morphologie der Endodyogeniestadien

Besnoitia besnoiti vermehrt sich sowohl auf Verozellen als auch auf CRFK-Zellen ausschließlich durch Endodyogenie. Hinweise auf andere ungeschlechtliche Vermehrungsarten (Endopolygenie, Schizogonie) oder auf eine Gamogonie haben sich nicht ergeben.

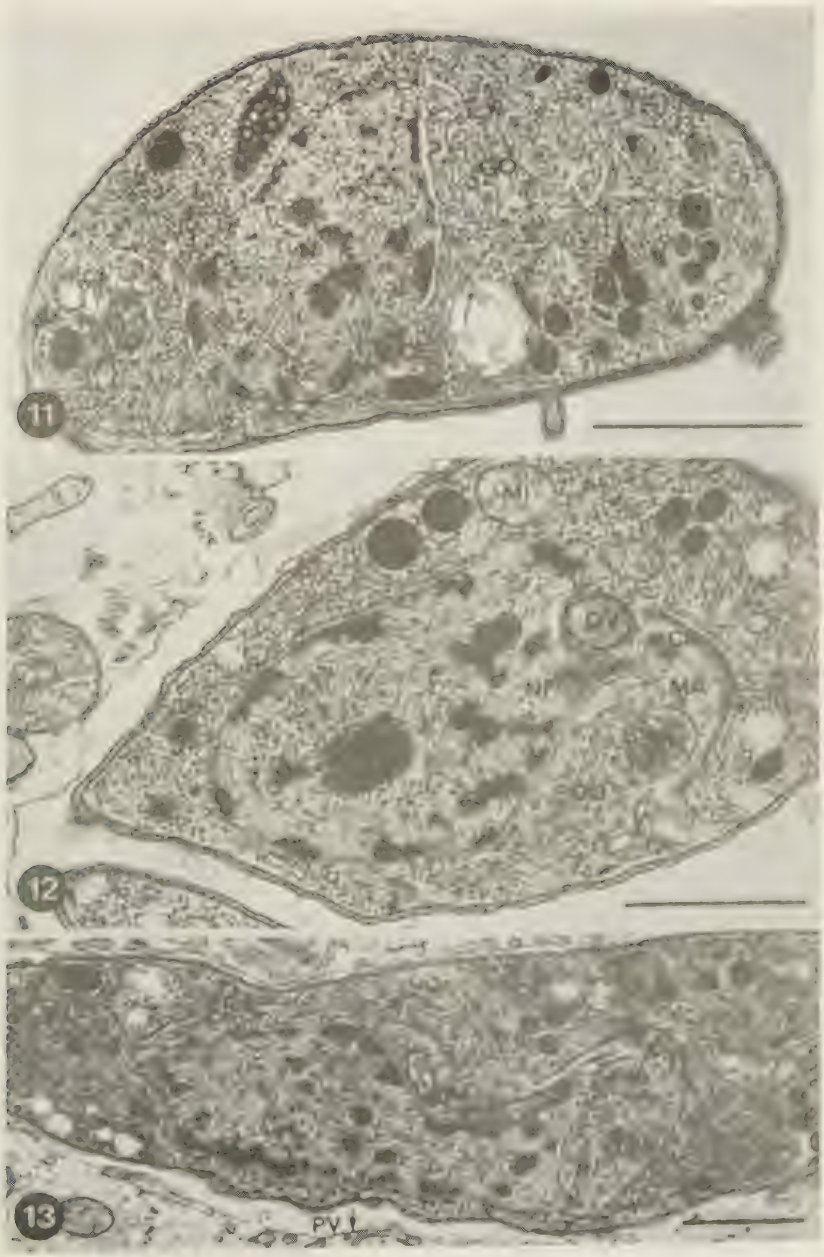
Zu Beginn der Endodyogenie werden im Zellkern der Mutterzelle dicht unter der Kernmembran liegende Kernspindeln beobachtet, denen im Zytoplasma die Zentriolen gegenüberliegen (Abb. 11 und 12). Durch die anschließend einsetzende Einbuchtung des Kerns entstehen zwei nach apikal gerichtete spitze Kernvorsprünge. Parallel dazu wird im darüberliegenden Zytoplasma die Bildung zweier konkav gewölbter Membranen sichtbar, die jeweils eine offene Kappe über den Kernausbuchtungen formen und die inneren Membranen der Tochterzellen (Merozoitenanlagen, MA) darstellen (Abb. 12 und 13). Bereits in diesem Stadium ist in einer Aussparung in der Wölbung der Membran die Anlage des Conoids (Abb. 13, C) zu erkennen. Auch die subpellikulären Mikrotubuli sind bereits angelegt (Abb. 19).

Abb. 11 - 13: Beginnende Endodyogenie bei Besnoitia besnoiti

11: Ausgeprägte Zentriole verdeutlicht beginnende Vermehrung, (Verozellen, 24 Stunden p.i.)

12: Mutterzelle mit Merozoitenanlage (MA); einer Kernspindel (NF) liegt im Zytoplasma die Zentriole gegenüber; dicht daneben befindet sich der dickwandige Vesikel (DV); innerhalb der Merozoitenanlage stellt sich eine junge Rhoptrie (RH) dar, (Verozellen, 2 Tage p.i.)

13: Mutterzelle mit Merozoitenanlage (MA) mit sich entwickelndem Conoid (C); der langgestreckte dickwandige Vesikel (DV) liegt seitlich am Nukleus, (Verozellen, 2 Tage p.i.)


11
12
13
PV

Daneben erscheint ein kreisrunder Vesikel von ca. 160 nm Durchmesser, mit unregelmäßig granuliertem, mäßig osmiophilem Inhalt; hier handelt es sich um junge Rhoptrien (Abb. 12 und 19). Die Tochterzellmembranen dehnen sich zunehmend nach hinten aus und umschließen einen Teil des Mutterzellzytoplasmas (Abb. 14); dabei bleibt stets noch eine offene Verbindung zur Mutterzelle. An den Enden der Membranen sind im fortgeschrittenen Stadium osmiophile Verdickungen, analog zum hinteren Polring, sichtbar (Abb. 16, Pfeile).

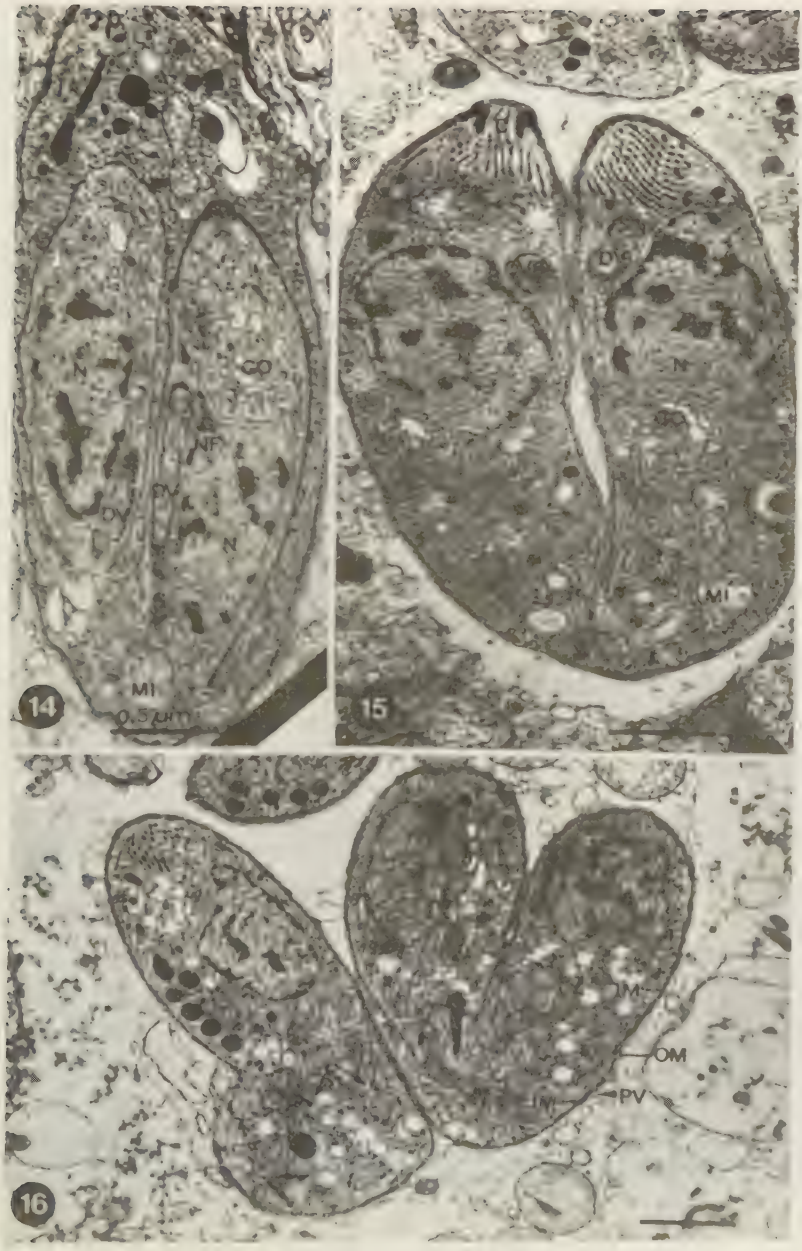
Gleichzeitig mit dem Anwachsen der Tochterzellmembranen schnürt sich der Mutterzellkern immer tiefer ein; er erhält damit ein hufeisenförmiges Aussehen, bevor er sich endgültig teilt. Am Ende der Kernteilungsvorgänge liegen in der Mutterzelle zwei Tochterzellen mit je einem eigenen Kern (Abb. 14). Sie besitzen am hinteren Pol noch eine offene Verbindung zum Mutterzellzytoplasma, welche sich aber jetzt zunehmend verengt(Abb. 14 - 16). Das Auftreten einer Kernspindel (NF) in diesem Stadium weist darauf hin, daß noch vor Abschluß der Endodyogenie eine erneute Kernteilung stattfindet (Abb. 14).

Abb. 14 - 16: Fortgeschrittene Endodyogeniestadien von Besnoitia besnoiti

14: Mutterzelle mit 2 Merozoiten, in denen sich durch Ausbildung einer Kernspindel (NF) abermalige Teilungen andeuten; es besteht noch eine offene Verbindung zwischen Merozoiten und Mutterzelle, (Verozellen, 2 Tage p.i.)

15: 2 Merozoiten, über einen schmalen Zytoplasmasaum an ihrer Basis verbunden, (Verozellen, 7 Tage p.i.)

16: Mutterzellen (MZ) mit je zwei Merozoiten (TZ); die Membranen der TZ besitzen an ihren Enden osmiophile Verdickungen (Pfeile); das innere Membranblatt (IM) der Mutterzellpellikula löst sich auf, das äußere Membranblatt (OM) wird von der Tochterzelle übernommen, (Verozellen, 4 Tage p.i.)


14
MI
0.5 µm
15
MI
16
IM
OM
IM
PV

Die heranwachsenden Merozoiten füllen die Mutterzelle immer mehr aus und erreichen schließlich am vorderen Pol deren Pellikula. Diese beginnt sich in der Mitte einzufalten und legt sich dadurch kappenartig über die Merozoiten (Abb. 15 und 16). Die Einfaltung setzt sich nach hinten fort, sodaß die beiden jungen Merozoiten zunehmend voneinander getrennt werden (Abb. 15).

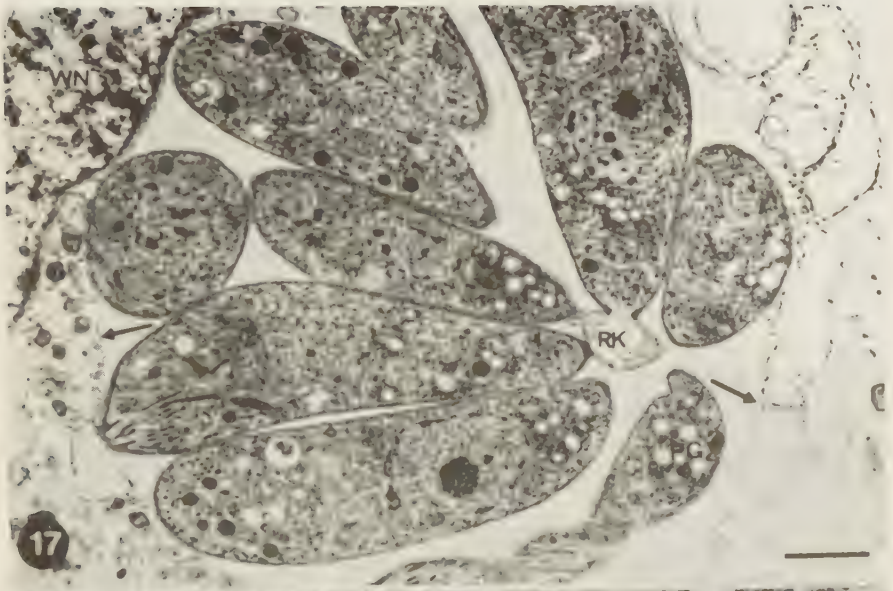
Dort wo die Membranen aufeinandertreffen, löst sich das innere Membranblatt der Mutterzellpellikula auf, während deren äußeres Blatt von den Tochterzellen vollständig übernommen wird (Abb. 16). Die beiden jungen Merozoiten sind jetzt nur noch durch einen schmalen Zytoplasmasaum an ihrer Basis verbunden (Abb. 15).

Nach Abschluß der Trennungsvorgänge liegt die Pellikula am hinteren Pol geschlossen vor. In einigen Fällen konnte die Bildung eines Restkörpers beobachtet werden, mit dem zahlreiche Merozoiten noch verbunden sind (Abb. 17 und 18). Er stellt sich als schaumig-wabiges elektronenlichtes Gebilde dar, in dem Zytoplasmareste der Mutterzelle liegen. Die an den Enden verdickte innere Membran der Merozoiten ist zum Restkörper hin noch geöffnet, während die Außenmembranen gemeinsam den Restkörper umschließen (Abb. 18).

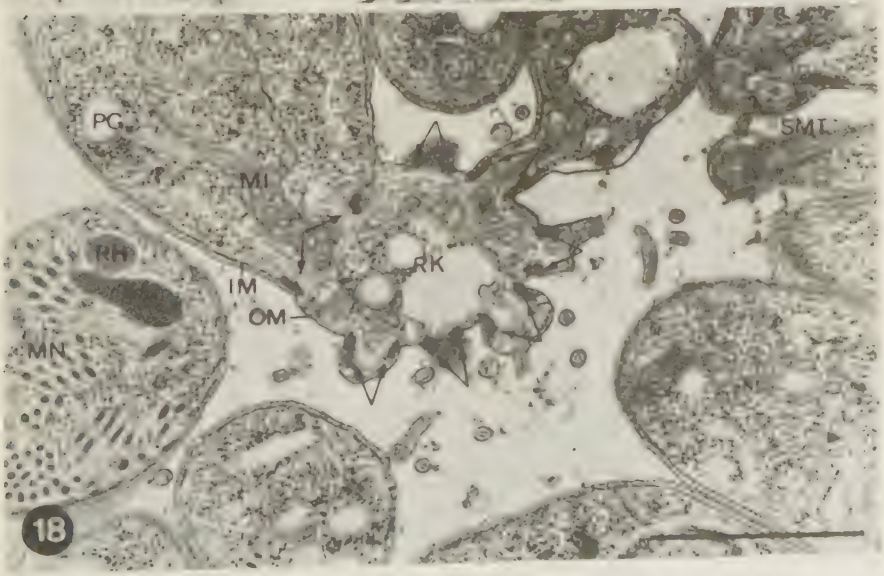
Abb. 17 - 18: Verzögerte Merozoitentrennung nach wiederholter Endodyogenie

17: Die Vakuolarmembran (Pfeil) umschließt eine weite parasitophore Vakuole; 3 Merozoiten sind über einen Restkörper (RK) miteinander verbunden, (CRFK-Zellen, 2 Tage p.i.)

18: Querschnitt durch einen Restkörper (RK), mit dem zahlreiche Merozoiten verbunden sind; die inneren Membranblätter der Merozoiten besitzen verdickte Enden (Pfeile), (CRFK-Zellen, 2 Tage p.i.)



17



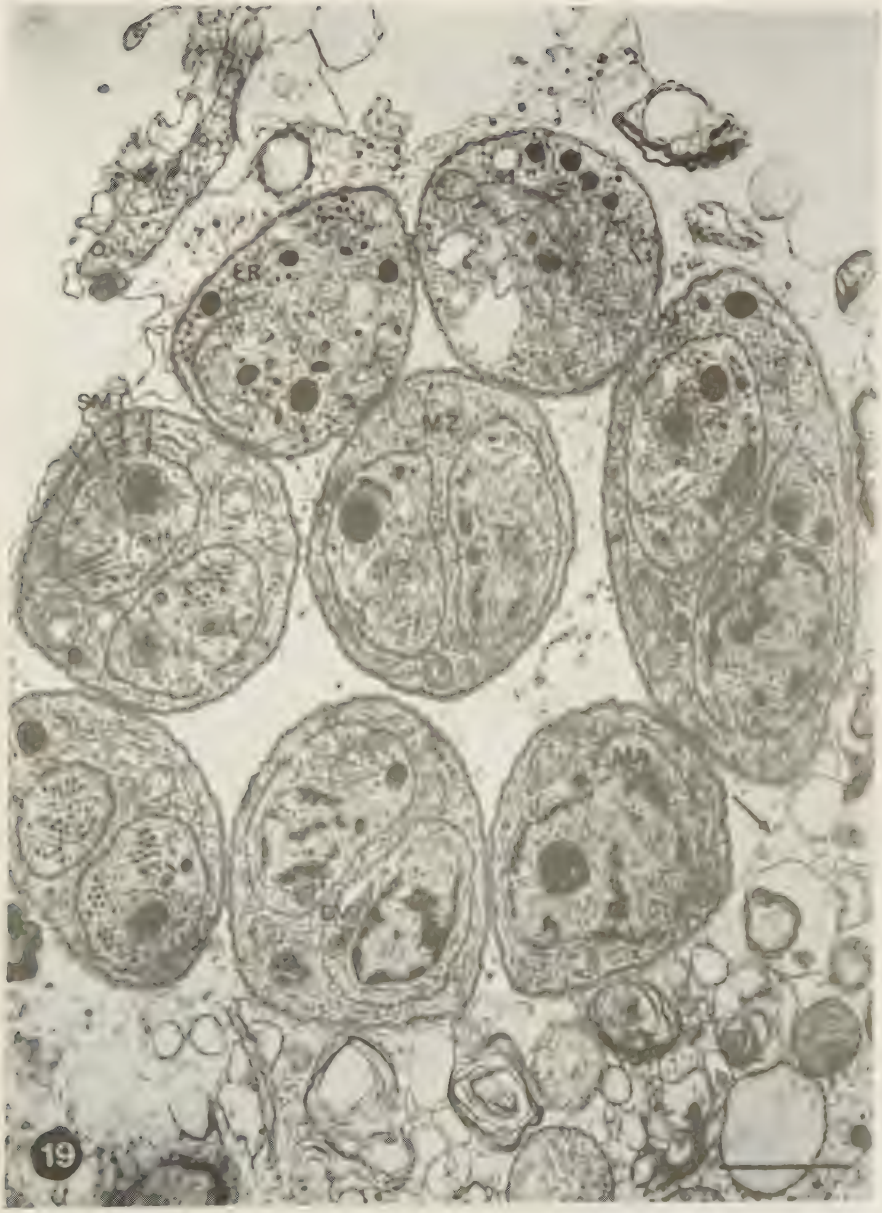
18

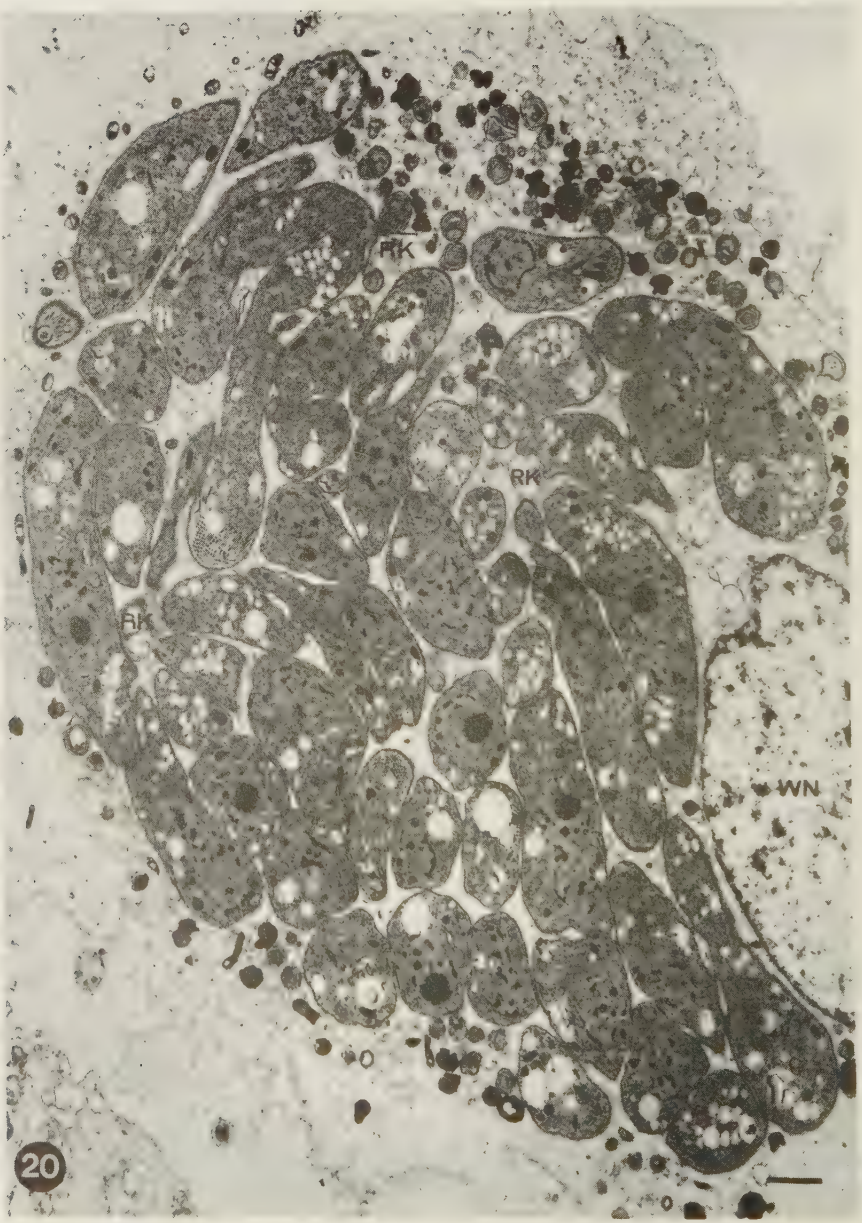
Ein auffälliges Organell konnte unmittelbar vor, während oder kurz nach der Teilung nachgewiesen werden; es handelt sich um den sog. dickwandigen Vesikel oder das Golgi-Adjunkt (Abb. 12 - 16, DV). Zu Beginn der Endodyogenie liegt es in unmittelbarer Nähe der einsetzenden Teilungsvorgänge, dem Kern und dem Golgi-Apparat eng benachbart. Oft besitzt der jetzt runde bis ovoide 0,6 µm große Vesikel eine Einschnürung.Später ist er dann als langgestrecktes Gebilde seitlich der Nuclei beider Tochterzellen sichtbar (Abb. 13 und 14). Kurz nach der abgeschlossenen Teilung liegt er wieder in ursprünglicher Form und Lage in jedem Merozoiten vor (Abb. 15).

Gelegentlich wurde beobachtet, daß Teilungen der sich gemeinsam in einer parasitophoren Vakuole befindenden Parasiten zueinander synchron ablaufen (Abb. 19).

Abb. 19: Parasitophore Vakuole (Pfeil = Begrenzung der parasitophoren Vakuole) mit 8 quer angeschnittenen Merozoiten, die sich synchron durch Endodyogenie vermehren; die subpellikulären Mikrotubuli (SMT) der Tochterzellen sind dargestellt, (Verozellen, 4 Tage p.i.)

Abb. 20: Sehr große parasitophore Vakuole mit vielen angeschnittenen Merozoiten und mehreren Restkörpern (RK), (CRFK-Zellen, 3 Tage p.i.)


ER
SM
M2
19


RK
RK
RK
WN
20

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Vermehrung von Besnoitia besnoiti ist sowohl in Vero-, als auch in CRFK-Zellen möglich. In Verozellen verlief auch nach insgesamt 168 Passagen im virologischen Labor unseres Institutes die Reproduktion der Parasiten noch sehr rege; diese Zellart gilt als zuverlässig für eine kontinuierliche Produktion der Parasiten. Ähnliche Ergebnisse erzielte NEUMAN (1974) mit Schafthyreoideazellen, in denen er Besnoitia besnoiti über 4 1/2 Jahre passagierte.

Die Vermehrung in den CRFK-Zellen verlief während der 22 durchgeführten Passagen etwas schneller als in den Verozellen. Bei ersteren waren schon nach 2-3, bei letzteren nach 3-4 Tagen die meisten intrazellulären Parasiten zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß Katzenzellen als Wirtszellen besonders gute Voraussetzungen für eine Vermehrung der Besnoitien bieten. Auf beiden Zelltypen waren jedoch erst frühestens 24 Stunden p.i. erste Anzeichen einer Vermehrung der eingedrungenen Parasiten zu beobachten, während NEUMAN (1974) bei Beimpfung von Schafthyreoideazellen schon 1 Stunde p.i. Endodyogeniestadien, 24 Stunden p.i. das Auftreten von Rosettenformen beschrieb.

Die von uns ermittelte Anzahl von Parasiten in einer parasitophoren Vakuole (ca. 60) stimmt weitgehend mit den Angaben von NEUMAN (1974) überein, der bis zu 64 Parasiten pro Vakuole zählte. Dagegen beschrieben FAYER und Mitarb. (1969) bei Anzüchtung von Besnoitia jellisoni in bovinen embryonalen Nierenzellen (BES) bis zu 164 Zoiten in einer parasitophoren Vakuole.

Unmittelbar nach Beimpfung der Zellkulturen drangen nur wenige Parasiten in die Zellen ein, die meisten degenerierten. Ähnliche Beobachtungen machten AZAB und BEVERLEY

(1974) bei der Beimpfung menschlicher embryonaler Lungenzellen mit Toxoplasmen, wobei sie den Anteil der eindringenden Parasiten auf 2 % schätzten. Auch BIGALKE (1962) stellte fest, daß ein Großteil der extrazellulären Parasiten offensichtlich nicht infektionstüchtig ist. In unseren Untersuchungen zeigten viele extrazelluläre Parasiten bereits zum Impfzeitpunkt Degenerationserscheinungen; sie waren demzufolge nicht mehr in der Lage, in die Zellen einzudringen.

Die Lichtmikroskopie hat ergeben, daß neben größeren auch kleinere gedrungenere Zoiten auftreten. Messungen ergaben Ausmaße von 6-8,5 x 1,5-3,2 µm; bei den kleineren Formen dürfte es sich um extrazelluläre Parasiten handeln, die bereits infolge beginnender Degeneration etwas geschrumpft sind. Auch NEUMAN (1974) stellte eine kontinuierliche Größenabnahme bei extrazellulären Parasiten fest, während die Größe der intrazellulären Formen mit einer Länge von 7-8,6 µm nur gering differierte.

Die von POLS (1954 a und b, 1960) beobachteten starken Größen- und Formschwankungen bei Besnoitia besnoiti (5-9 x 2-5 µm), die er als natürlichen Polymorphismus wertete, traten in der Zellkultur nicht auf. Auffällig waren gelegentlich auftretende ovale, sehr breite, fast gequollen erscheinende Parasiten, bei denen es sich um unmittelbar vor der Teilung sich befindende Mutterzellen handelte. Ähnliche Formen treten auch bei Isospora felis kurz vor Beginn der Endodyogenie auf (GÖBEL und SCHÖNWEITZ, 1982).

Der Aufbau der Pellikula und die Ausbildung des Apikalkomplexes, bestehend aus Polring, Conoid und Rhoptrien, gleicht bei Besnoitia besnoiti dem anderer Sporozoen aus der Gruppe der Apikomplexa. Die Membranblätter, aus denen sich die Pellikula zusammensetzt, wiesen mit ca. 10 nm bzw. 15 nm dieselbe Dicke auf, wie sie von SHEFFIELD (1966) bei

Besnoitia jellisoni gemessen wurde. Die Anzahl der Rhoptrien dürfte mit bis zu 12 pro Merozoit etwas höher liegen als bei Besnoitia jellisoni (3-5) und (4-8) bei Toxoplasma gondii (SCHOLTYSECK, MEHLHORN und MÜLLER, 1973). Ein Vesikel im kranialen Bereich der Zoiten, der über einen Ausführungsgang ins Conoid mündet, wie ihn SHEFFIELD (1966) bei Besnoitia jellisoni häufig sah, konnten wir bei Besnoitia besnoiti nicht beobachten. Dagegen fielen uns Bläschen im Conoid auf, die ein Hinweis darauf sind, daß ein Stoffaustausch mit der parasitophoren Vakuole stattfindet. Das Conoid mit einem Basisdurchmesser von 0,23 µm und einer Höhe von 0,25 µm weist ähnliche Ausmaße auf wie bei Besnoitia jellisoni (SCHOLTYSECK, MEHLHORN und MÜLLER, 1973).

Bei einem Vergleich des Aufbaus von Conoid und vorderem Polring stellten wir erhebliche Abweichungen zu den Ergebnissen von SCHOLTYSECK, MEHLHORN und FRIEDHOFF (1970) an Besnoitia jellisoni fest. Hier bestand das Conoid aus 6-7 Spiralen, präconoidale Ringe konnten nicht dargestellt werden. Unsere Untersuchungen an Besnoitia besnoiti ergaben zwei präconoidale Ringe. Auch der differenzierte Aufbau der beiden vorderen Polringe, wie er von uns bei Merozoiten von Besnoitia besnoiti beschrieben wird, unterscheidet sich von Besnoitia jellisoni durch die zusätzliche Verdickung der Innenmembran der Pellikula.

Insgesamt fällt bei der Untersuchung der Ultrastruktur von Besnoitia besnoiti die Ähnlichkeit mit Toxoplasma auf, die SHEFFIELD (1966) auch bei Besnoitia jellisoni feststellte. Es gelang uns jedoch einige, wenn auch nur geringe Unterschiede zur Ultrastruktur von Toxoplasma nachzuweisen. So konnten wir die Ausbildung eines hinteren Polringes, wie er bei Toxoplasma regelmäßig beschrieben wird (SHEFFIELD, 1968; SCHOLTYSECK, MEHLHORN und MÜLLER, 1973), bei Besnoitia besnoiti nicht beobachten. Lediglich während der Endodyogenie besitzen die hinteren Enden der Tochterzell-

membranen osmiophile Verdickungen; sie sind bereits unmittelbar nach Abschluß der Teilung nicht mehr vorhanden, da die beiden Enden der inneren Doppelmembran der Pellikula miteinander verschmelzen. Auch die jungen Merozoiten besitzen demzufolge keinen hinteren Polring, wie dies auch für Besnoitia jellisoni beschrieben wurde.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu Toxoplasma ist der Verlauf der subpellikulären Mikrotubuli. Diese ziehen bei Toxoplasma in spiraligen Windungen vom vorderen zum hinteren Polring, während sie bei Besnoitia besnoiti geradlinig divergierend unter der Pellikula entlanglaufen. Ähnliche Beobachtungen machte SHEFFIELD (1966) auch bei Besnoitia jellisoni. Während das Conoid von Besnoitia besnoiti weitgehend dem von Toxoplasma gleicht, besteht der vordere Polring von Toxoplasma nur aus einer einzigen Verdickung der Innenmembran der Pellikula (SCHOLTYSECK, MEHLHORN und FRIEDHOFF, 1970).

Ein besonders auffälliges Organell,das offensichtlich in engem Zusammenhang mit den Teilungsvorgängen im Ablauf der Endodyogenie steht, ist der sog. dickwandige Vesikel oder das Golgi-Adjunkt. Sein Auftreten im Initialstadium der Endodyogenie wurde auch bei Toxoplasma von SHEFFIELD und MELTON (1968), bei Frenkelia von KEPKA und SCHOLTYSECK (1970) sowie bei Sarcocystis von RUIZ und FRENKEL (1976) beschrieben. Bei meinen Untersuchungen konnte ich eine Form- und Lageveränderung während der Endodyogenie beobachten; der nach seiner Teilung zunehmend elongierte Vesikel verlagerte sich seitlich am Nukleus vorbei in die hintere Hälfte der Merozoiten. Auch wenn die Bedeutung des Golgi-Adjunkts bisher nicht geklärt ist, wird ihm eine wesentliche Funktion im Ablauf der Endodyogenie zugeschrieben.

Bei Toxoplasma und bei Frenkelia treten im Initialstadium

der Endodyogenie zwei osmiophile Verdichtungen im Kern, die sog. E-Körper (= Endodyogeniekörper) auf, die an den Kernrand wandern und die Kernmembran im Bereich der neu entstehenden Merozoiten ausbuchten (SHEFFIELD und MELTON, 1968; SCHOLTYSECK, 1973). Eine derartige Zusammenballung von Kernmaterial konnte bei Besnoitia besnoiti nicht beobachtet werden.

Während VAN DER ZYPEN und PIEKARSKI (1967) bei der Endodyogenie von Toxoplasma gondii eine Auflösung der Kernmembran im Bereich der Kernspindel sahen, blieb bei Besnoitia besnoiti die Kernmembran in diesem Bereich intakt; dies beschrieben SCHOLTYSECK (1973) sowie SHEFFIELD und MELTON (1968) auch an Frenkelia und Toxoplasma. Einen degenerierenden Kernrest, wie ihn VAN DER ZYPEN und PIEKARSKI (1967) bei Toxoplasma und KEPKA und SCHOLTYSECK (1970) bei Frenkelia sahen, konnte ich bei Besnoitia besnoiti nicht beobachten.

Einen Restkörper im Zusammenhang mit der Bildung von rosettenförmigen Anordnungen der Merozoiten beobachteten BIGALKE (1962) und NEUMAN (1974) für Besnoitia besnoiti, AKINCHINA und DOBY (1969) für Besnoitia jellisoni, SHEFFIELD, MELTON und NEVA (1976) für Hammondia hammondi sowie SHEFFIELD und MELTON (1968) für Toxoplasma. Grundsätzlich kommen zwei Möglichkeiten für die Entstehung dieser Formationen in Betracht. Einmal können von einer Mutterzelle ausgehend mehrere Endodyogenien hintereinander ablaufen, ohne daß es zur vollständigen Trennung der Tochterzellen kommt; dabei sind schließlich alle Merozoiten an ihrer Basis über einen Restkörper miteinander verbunden. Daß bereits eine neue Teilung stattfinden kann, bevor sich die Merozoiten voneinander gelöst haben, wurde in unseren Untersuchungen durch das Auftreten einer neuen Kernspindel an den Nuclei noch nicht ausdifferenzierter Tochterzellen bestätigt. Dieselben Beobachtungen machten

SHEFFIELD, MELTON und NEVA (1976) an Zellkulturformen von Hammondia hammondi. Die hierbei entstehenden Formationen wiesen stets Zoitenzahlen mit einem Vielfachen von 2 auf; dabei war oft noch deutlich eine paarweise Zuordnung der Parasiten zu erkennen. Welche Einflüsse die Trennung der Tochterzellen verzögern, ist bisher nicht geklärt. Auffällig ist jedoch, daß diese Formen meist nur bei in Zellkultur gezüchteten oder bei zellkulturadaptierten Parasiten beobachtet wurden.

Daneben kommt für die Entstehung der Rosettenformen auch eine Vielfachteilung (Endopolygenie oder Schizogonie) in Betracht. Im Gegensatz zur Endodyogenie laufen Endopolygenie und Schizogenie in 2 Phasen ab. In der ersten Phase kommt es zu Kernteilungen, die zu einer Vielkernigkeit der Mutterzelle führen. Bei der Endopolygenie beginnt erst im vierkernigen Stadium die Entwicklung von Merozoiten, die jetzt nach dem Muster der Endodyogenie ausgebildet werden (PIEKARSKI, PELSTER und WITTE, 1970). Der vielkernige junge Schizont teilt sich in die sog. Cytomeren auf, die im zweiten Abschnitt der Schizogonie ebenfalls eine Endodyogenie durchführen (SCHOLTYSECK, 1973). Einer Schizogonie oder Endopolygenie geht also stets ein mehrkerniges Stadium voraus, das bei der Endodyogenie fehlt. Da ich bei meinen Untersuchungen weder licht- noch elektronenmikroskopisch mehrkernige Parasiten nachweisen konnte, ist anzunehmen, daß die hier auftretenden Rosettenformen durch fortlaufende Endodyogenien entstanden sind.

Die aufgrund der Forschungsergebnisse an Sarcocystis zu erwartende sexuelle Vermehrung von Besnoitia besnoiti auf dem Endwirt-äquivalenten Zellsystem (CRFK-Zellen) konnten wir nicht beobachten. Ein Grund hierfür könnte in der hohen Passagerate der Parasiten liegen, die im Rahmen von Anpassungsvorgängen an die Zellkultur zu Veränderungen der Parasiteneigenschaften führte.

V. Zusammenfassung

An auf Vero- und CRFK-Zellen gezüchteten Besnoitia besnoiti wurde die Morphologie von Merozoiten und Endodyogeniestadien licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

Die intrazellulären Parasiten liegen in parasitophoren Vakuolen, in denen 24 Stunden nach der Beimpfung die ersten Vermehrungsstadien auftreten. Die 6 x 1,5 - 8 x 3,2 µm großen Merozoiten zeigen den für Kokzidien charakteristisch ausgebildeten Apikalkomplex, bestehend aus Polring, Conoid, Rhoptrien (bis zu 12) und Mikronemen (bis zu 100). Im Gegensatz zu Besnoitia jellisoni besitzt das Conoid von Besnoitia besnoiti 2 präconoidale Ringe.

Auf beiden Zellsystemen vermehren sich die Besnoitien ausschließlich durch Endodyogenie, wobei aus einer Mutterzelle zwei Tochtermerozoiten entstehen. Ein auffälliges Organell, das während der Endodyogenie beobachtet werden konnte, ist der sog. dickwandige Vesikel oder das Golgi-Adjunkt, welcher zu Beginn der Teilungsvorgänge in der Nähe der Kernspindeln liegt und sich später in die hintere Hälfte der Merozoiten verlagert. Durch fortlaufende Endodyogenien entstehen bei verzögerter Trennung der Tochterzellen rosettenförmige Anordnungen der Merozoiten, die über einen Restkörper an ihrer Basis verbunden sind.

Widauer, R. : Light and electron microscopic studies on the asexuel multiplication of Besnoitia besnoiti (Sporozoa, Apicomplexa) in cell cultures

Summary

The morphology of merozoites and endodyogenous stages of Besnoitia besnoiti cultured in Vero- and CRFK-cells was investigated by light and electron microscopical studies.

The intracellular parasites are contained within a parasitophorous vacuole, where 24 hours after inoculation the first division stages appear. The size of the merozoites varies from 6 x 1,5 to 8 x 3,2 µm. They show an apical complex that is typical for coccidian parasites, consisting of a polar ring, a conoid, rhoptries (up to 12) and micronemes (up to 100). In contrast to Besnoitia jellisoni the conoid of Besnoitia besnoiti possesses two preconoidal rings.

In both cell lines Besnoitia besnoiti multiplicates exclusively by endodyogeny, at which two daughter merozoites develop from one mother cell. A striking organell, the socalled dickwandige Vesikel or Golgi-adjunct could be observed during the endodyogeny. At the beginning it is situated near the centrioles, later it displaces backwards into the posterior part of the merozoites. In connection with delayed separation of the daughter cells repeated endodyogenies lead to formation of rosette-shaped arrangements of the merozoites, that are connected with each other by a residual body.

VI. Literaturverzeichnis

Akinchina, G.T., J.M. Doby (1969):

Multiplication de Besnoitia jellisoni Frenkel, 1953 (Protozoaires, Toxoplasmatea) en cultures de cellules de tissue d'origine differentes.

Protistologica 2, 249-253

Azab, M., J.K.A. Beverly (1974):

Schizogony of Toxoplasma gondii in tissue cultures.

Z. Parasitenk. 44, 33-41

Basson, P.A., R.M. Mc.Cully, R.D. Bigalke (1970):

Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) infection in cattle and rabbits.

Onderstepoort J. Vet. Res. 37, 105-126

Barrairon, E. (1938):

Contribution a l'étude étiologie de l'anasarque du boeuf.

Thesis,Toulouse

Becker, B., H. Mehlhorn, A. Heydorn (1979):

Light and electron microscopic studies on gamogony and sporogony of 5 Sarcocystis species in vivo and in tissue cultures.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 244, 394-404

Besnoit, C., V. Robin (1912):

Sarcosporidiose cutanée chez une vache.

Rev. vét. Toulouse 37, 649-663

Bigalke, R.D. (1960):

Preliminary observations on the mechanical transmission of cyst organisms of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) from a chronical infected bull to rabbits by Glossina brevipalpis Newstead, 1910.

J. S. Afr. vet. med. Ass. 31, 37-44

Bigalke, R.D. (1962):

Preliminary communication on the cultivation of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) in tissue culture and embryonated eggs.

J. S. Afr. vet. med. Ass. 33, 523-532

Bigalke, R.D., T.W. Naudé (1962):

The diagnostic value of cysts in the scleral conjunctiva in bovine besnoitiosis.

J. S. Afr. vet. med. Ass. 33, 21-27

Bigalke, R.D. (1967):

The artificial transmission of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) from chronically infected to susceptable cattle and rabbits.

Onderstepoort J. vet. Res. 34, 303-316

Bigalke, R.D., J.W. van Niekerk, R.M. Mc.Cully, P.A. Basson (1967):

Studies on the relationship between Besnoitia of blue wildebeest and impala and Besnoitia of cattle.

Onderstepoort J. vet. Res. 34, 7-28

Bigalke, R.D. (1968):

New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations.

Onderstepoort J. vet. Res. 35, 3-138

Bigalke, R.D., J.H. Schoeman, R.M. c.Cully (1974):

Immunisation against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of Besnoitia besnoiti grown in cell cultures.

Onderstepoort J. vet. Res. 41, 1-6

Brumpt, E. (1913):

Précis de Parasitologie 2nd. ed., Vigot Frères, Paris.

Bwangamoi, O. (1967):

A preliminary report on the finding of Besnoitia besnoiti in goat skins affected with dimple in Kenya.

Bull. epiz. Dis. Afr. 15, 263-271

Choquette, L.P.E., E. Broughton, F.L. Miller, C. Gibbs, J.C. Cousineau (1967):

Besnoitiosis in barren ground caribou in Northern Canada.

Can. vet. J. 8, 282-287

Cuillé,J., P.L. Chelle (1937a):

Nouvelles recherches sur la transmission expérimentale de la maladie appelée "Anasarque des bovides" (Globidiose cutanée du boeuf).

Bull. Acad. Méd. 118, 217-219

Cuillé,J., P.L. Chelle (1937b):

Recherches sur les modes de l'infestation naturelle de l'Anasarque (Globidiose) des bovidés.

Bull. Acad. Méd. 118, 449-452

Cuillé,J., P.L. Chelle, F. Berlureau (1936):

Transmission expérimentale de la maladie dénommée "Sarcosporidiose cutanée" du boeuf (Besnoit et Robin) et determinée par Globidium besnoiti.

Bull. Acad. Méd. 115, 161-163

Enigk, K., T. Stirtz (1963):

Ein durch die Rinderkrankheit "Besnoitiosis" verursachter Lederfehler.

Das Leder 14, 124

Fayer, R., D.M. Hammond, B. Chobotar, Y.Y. Elsner (1969):

Cultivation of Besnoitia jellisoni in bovine cell cultures.

J. Parasit. 55, 645-653

Fayer, R. (1972):

Sarcocystis: Development in cultured avian and mammalian cells.

Science 168, 1104-1105

Fedoseenko, V.M. (1979):

Ultrastruktura tsist Besnoitia besnoiti.

Leningrad USSR; "Nauka"
Protozoologiya 4, 100-105

Frenkel, J.K. (1953):

Infections with organisms resembling Toxoplasma, together with the discription of a new organism: Besnoitia jellisoni.

Atti VI. Congr. Mikrobiol. Rome, 426-434

Göbel, E., W. Schönweitz (1982):

Die Entwicklung von Cystoisospora felis im Katzendarm.

Adv. Vet. Med. 35, 278-281

Goldman, M., R.K. Carver, A.J. Sulcer (1957):

Similiar internal morphology of Toxoplasma gondii and Besnoitia jellisoni stained with silver protein.

J. Parasit. 43, 490-491

Henry, A. (1913):

Le travail des Mm. Besnoit et Robin. Egalement communique á la Société de Science Vétérinaires de Lyon.

Rec. Méd. Vét. 90, 327-328

Herrin, V.V. (1952):

Note sur l'existence de la Globidiose bovine au Ruanda-Urundi.

Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 32, 155

Hofmeyr, C.F.B. (1945):

Globidiosis in cattle.

J. S. Afr. vet. med. Ass. 16, 102-109

Jellison, W.L. (1956):
On the nomenclature of Besnoitia besnoiti, a protozoan parasite.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 54, 268-270

Kaliner, G. (1973):
Vorkommen von Besnoitiazysten in der Ziegenlunge.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86, 229-230

Kepka, O., E. Scholtyseck (1970):
Weitere Untersuchungen der Feinstruktur von Frenkelia spec. (=M-Organismus, Sporozoa).
Protistologica 3, 249-266

Lee, H.S., H.B. Lee, M.M. Moon (1979):
Studies on control and therapeutics of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) infection in Korean native cattle.
Korean J. Animal Sci. 21, 281-288

Marotel, M. (1912):
Discussion of paper by Besnoit and Robin.
Bull. et Mém. de la Société des Sciences Vétérinaires de Lyon et de la Société de Médicine Vétérinaire de Lyon et du Sud-Est 15, 196-217

Mc.Cully, R.M., P.A. Basson, J.W. van Niekerk, R.D. Bigalke (1966):
Observations on Besnoitia cysts in the cardiovascular system of some wild antelopes and domestic cattle.
Onderstepoort J. vet. Res. 33, 245-275

Mehlhorn, H., A.O. Heydorn (1979):
Electron microscopical study on gamogony of Sarcocystis suihominis in human tissue cultures.
Z. Parasitenk. 58, 97-113

Neuman, M., T.A. Nobel (1960):
Globidiosis of cattle and sheep in Israel.
Refuah vet. 17, 101-103

Neuman, M. (1962):

The experimental infection of the gerbil (Meriones tristami shawii) with Besnoitia besnoiti.

Refuah vet. 19, 184-188

Neuman, M., T.A. Nobel (1963):

Symptomatology and pathology of experimental besnoitiosis in the golden hamster.

J. Protozool. 10, Suppl. 34

Neuman, M. (1965):

Infection of laboratory white mice with Besnoitia besnoiti.

Refuah vet. 22, 201-205

Neuman, M. (1972):

Pathological changes causing sterility in bulls infected with Besnoitia besnoiti (Marotel 1912).

J. Protozool. 19, Suppl. 54, Nr. 154

Neuman, M. (1974):

Cultivation of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) in cell culture.

Tropenmed. Parasit. 25, 243-249

Neuman, M., T.A. Nobel (1981):

Observations on the pathology of besnoitiosis in experimental animals.

Zbl. Vet. Med. 28, 345-354

Nobel, T.A., M. Neuman, U. Klopfer, S. Perl (1977):

Kystes de Besnoitia besnoiti dans les organes geniteaux de la vache.

Bull. Acad. vet. France 50, 568-574

Peteshev, V.M., J.G. Galuzo, A.P. Polomoshov (1974):

Koshki - definitivnye khozyaeva besnoiti (Besnoitia besnoiti).

Izvestiya Akademii Nauk Kazakskoi SSR
Seria Biologicheskaya 1, 33-38

Piekarski, G., B. Pelster, H.M. Witte (1971):
Endopolygenie bei Toxoplasma gondii.
Z. Parasitenk. 36, 122-130

Pols, J.W. (1954a):
The artificial transmission of Globidium besnoiti (Marotel 1912) to cattle and rabbits.
J. S. Afr. vet. med. Ass. 25, 37-44

Pols, J.W. (1954b):
Preliminary notes on the behaviour of Globidium besnoiti (Marotel 1912) in the rabbit.
J. S. Afr. vet. med. Ass. 25, 45-48

Pols, J.W. (1960):
Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology.
Onderstepoort J. vet. Res. 28, 265-356

Rommel, M. (1975):
Neue Erkenntnisse zur Biologie der Kokzidien, Toxoplasmen, Sarkosporidien und Besnoitien.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 112-117

Ruiz, A., J.K. Frenkel (1976):
Recognition of cyclic transmission of Sarcocystis muris by cats.
J. Infect. Dis. 133, 409-418

Schneider, C.R. (1967):
The distribution of lizard besnoitiosis in Panama and its transfer to mice.
J. Protozool. 14, 678-683

Scholtyseck, E., H. Mehlhorn, K. Friedhoff (1970):

The fine structure of the conoid of sporozoa and related organisms.

Z. Parasitenk. 34, 68-94

Scholtyseck, E. (1973):

Die Deutung von Endodyogenie und Schizogonie bei Kokzidien und anderen Sporozoen.

Z. Parasitenk. 42, 87-104

Scholtyseck, E., H. Mehlhorn, B.E.G. Müller (1973):

Identifikation von Merozoiten der vier zystenbildenden Kokzidien (Sarcocystis, Toxoplasma, Besnoitia, Frenkelia) aufgrund feinstruktureller Kriterien.

Z. Parasitenk. 42, 185-206

Scholtyseck, E., H. Mehlhorn, B.E.G. Müller (1974):

Feinstruktur der Zystenwand von Sarcocystis tenella, Besnoitia jellisoni, Frenkelia sp. und Toxoplasma gondii.

J. Protozool. 21, 284-294

Schulz, K.C.A. (1960):

A report on naturally aquired besnoitiosis in bovines with special reference to its pathology.

J. S. Afr. vet. med. Ass. 31, 21-35

Schulz, K.C.A., J.A. Thorburn (1955):

Globidiosis - cause of dermatitis in horses.

J. S. Afr. vet. med. Ass. 26, 39-43

Sénaud, J. (1969):

Ultrastructure des formation kystiques de Besnoitia jellisoni (Frenkel 1953) Protozoaire, Toxoplasmea, parasite de la souris (Mus musculus).

Protistologica 5, 413-430

Sénaud, J., H. Mehlhorn (1978):

Besnoitia jellisoni (Frenkel 1953) en culture sur cellules de rein de chien (MDCK): Etude au microscope électronique.

Protistologica X/V, 5-14

Sénaud, J., H. Mehlhorn, E. Scholtyseck (1974):

Besnoitia jellisoni in macrophages and cysts from experimentally infected laboratory mice.

J. Protozool. 21, 715-720

Sheffield, H.G. (1966):

Electron microscope study of the proliferative form of Besnoitia jellisoni.

J. Parasit. 52, 583-594

Sheffield, H.G. (1967):

The function of the micropyle in the cyst organisms of Besnoitia jellisoni.

J. Parasitol. 53, 888-889

Sheffield, H.G. (1968):

Observations on the fine structure of the cyst-stage of Besnoitia jellisoni.

J. Protozool. 15, 685-693

Sheffield, H.G., M.L. Melton (1968):

Details of the fine structure and reproduction of Toxoplasma gondii.

J. Parasit. 54, 209-226

Sheffield, H.G., M.L. Melton, F.A. Neva (1976):

Development of Hammondia hammondi in cell cultures.

Proc. Helminthol. Soc. Wash. 43, 217-225

Smith, D.D., J.K. Frenkel (1977):
Besnoitia darlingi (Protozoa, Toxoplasmatidae), cyclic transmission by cats.
J. Parasitol. 63, 1066-1071

Tadros, W., J.J. Laarman (1979):
Some observations on the gametogony development of Sarcocystis cuniculi of the common european rabbit in a feline fibroblast cell line.
Acta Leidensia 47, 45-52

Terell, T.G., J.B. Stookey (1973):
Besnoitia benetti in two Mexican burros.
Vet. Path. 10, 177-184

Wenyon, C.M. (1926):
Protozoology. William Wood. New York, N.Y.

Wallace, G.D., J.K. Frenkel (1975):
Besnoitia species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae). Recognition of cyclic transmission by cats.
Science 188, 396-371

Van der Zypen, E., G. Piekarski (1967):
Die Endodyogenie bei Toxoplasma gondii. Eine morphologische Analyse.
Z. Parasitenk. 29, 15-35

Lebenslauf

Name	Rosina Maria Widauer, geb. am 8.7.1955 in Untersteppach
Eltern	Sebastian Widauer Rosina Widauer, geb. Posch
Schulen	1961-1968 Volksschule in Edling 1968-1972 Realschule in Wasserburg/Inn 1972-1973 Anschlußklasse am Rupertigymnasium in Mühldorf/Inn 1973-1975 Luitpoldgymnasium in Wasserburg/Inn Juni 1975 Abitur
Studium	1975-1976 Ökotrophologie an der Technischen Universität Freising-Weihenstephan 1976-1981 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	Dezember 1981
Approbation	März 1982
Promotionsstudium	Seit Januar 1982 am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie unter Leitung von Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. Boch

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials danke ich Herrn Professor Dr. Munz.

Herrn Dr. E. Göbel möchte ich für die stets freundlich gewährte Unterstützung und die Anregungen zu meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Hanna Meyer für die hervorragende technische Hilfe und Anleitung und Herrn M. Reimann für die Betreuung der Zellkulturen.